

Letícia de Oliveira Souza

**OS NANOCONTAMINANTES E O SISTEMA IMUNE
DE EQUINOIDES (ECHINODERMATA):
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pessoa
2024

Letícia de Oliveira Souza

**OS NANOCONTAMINANTES E O SISTEMA IMUNE
DE EQUINOIDES (ECHINODERMATA):
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Luis Fernando Marques dos Santos

João Pessoa
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729n Souza, Leticia de Oliveira.

Os nanocontaminantes e o sistema imune de equinoides (Echinodermata) - Uma revisão bibliográfica / Leticia de Oliveira Souza. - João Pessoa, 2024.
66 p. : il.

Orientação: Luis Fernando Marques-Santos.

TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Nanoecotoxicologia. 2. Ouriços-do-mar. 3. Sistema imune. I. Marques-Santos, Luis Fernando. II. Título.

UFPB/CCEN

CDU 57(043.2)

Letícia de Oliveira Souza

**OS NANOCONTAMINANTES E O SISTEMA IMUNE DE
EQUINOIDES (ECHINODERMATA) - UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas, como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas da
Universidade Federal da Paraíba.

Data: 18 de outubro de 2024

Resultado: Aprovada (8,33)

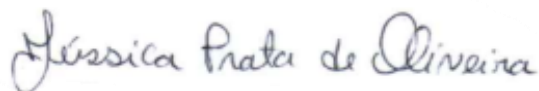
BANCA EXAMINADORA:



Luis Fernando Marques dos Santos (Orientador), Professor Doutor, UFPB



Catarina Serrão Carlos da Costa, Mestre, UFPB (Titular)



Jéssica Prata de Oliveira, Pesquisadora Doutora, UFPB (Titular)

*“Eu queria ser feliz
Invento o mar
Invento em mim o sonhador
Invento o cais
E sei a vez de me lançar”*

Milton Nascimento

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primordialmente, à minha família: minha mãe, minha irmã, meu padrasto, meu pai e meus avós, Edilene Oliveira, Sabrina Oliveira, Elenildo José, Marivaldo Almeida, Socorro Almeida, Mário Luiz, Isabel Oliveira e João Humberto (Pai João), respectivamente. Desde pequena, vocês acreditaram em mim e foram a base para que eu chegasse até aqui, e quando adulta, me ensinaram que eu não preciso estar sozinha nessa jornada.

Mãe, você sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e seu amor sempre me acompanhará. Obrigada por entender que a distância, embora difícil, pode ser necessária na caminhada da vida. Sabrina, obrigada por lutar pelos meus sonhos e ajudar a torná-los realidade, isso não teria sido possível sem você. Elenildo, o pai que eu ganhei e que tanto se orgulha de mim. Vovó Socorro e vovó Nega, obrigada por todo o amor e cuidado. Obrigada, Pai João, por se orgulhar até o último momento.

Agradeço à Aghatta Meireles, minha companheira da vida e que acompanhou de perto essa jornada quase por completa. Me ensinou a ver as dificuldades e frustrações da vida com mais leveza, e esteve comigo nos maiores perrengues, nos momentos de muito trabalho, mas principalmente nos momentos mais alegres e especiais. Você foi e é essencial na minha trajetória e também me apoiou para que eu não desistisse em tantas coisas. Obrigada por enxergar a melhor parte de mim e por sonhar junto comigo.

À família que a vida me deu, Danielle Meireles, Amanda Meireles e Adryan Meireles, obrigada por todo o suporte e acolhimento, finalizar essa etapa sem esse auxílio seria muito difícil. Agradeço às minhas tias Tânia Sá Barreto e Maritelma Almeida que, a princípio, me acolheram e possibilitaram o início desse curso.

Ao meu orientador, Luis Fernando, pela oportunidade que me foi concedida logo no início do curso e novamente agora. Você foi essencial nessa jornada de aprendizado e me mostrou a beleza através da Biologia Celular e a importância da pesquisa científica. Você exerce sua profissão com maestria e serve de inspiração para toda a equipe. Muito obrigada pela compreensão, disponibilidade e paciência ao longo desses meses, espero continuar aprendendo com você!

Aos meus amigos e equipe do LABID: Catarina Serrão, Bianca Mataribu, e ex-integrates, Amanda Dantas, Mikaelle Medeiros, Samuel Freire, obrigada por todos os momentos, pela parceria, acolhimento e ajuda. Mesmo com suas obrigações, vocês não mediram esforços para me ajudar nos experimentos ou me apoiar nas atividades. Pelos

momentos de descontração, alegrias e conversas, obrigada. Em especial, Catarina e Bianca, que desde o início, seguem me dando luz quando estou mais perdida e me ajudando a enxergar tudo com mais clareza e menos ansiedade. Vocês têm sido essenciais nessa etapa final. Obrigada por todo apoio e amizade!

Ao longo do curso, trilhei vários caminhos por onde aprendi muita coisa. Por isso, gostaria de agradecer aos professores que fizeram parte dessa história e me deram oportunidades de participar de projetos como bolsista, incentivo que foi essencial também para que eu pudesse me manter. Aos professores Claudio Roberto e Fernando Ferreira, obrigada pelas oportunidades. Agradeço, em especial, à professora Alecksandra Vieira, que fez parte do início dessa jornada acadêmica e me mostrou o caminho da universidade.

Aos meus amigos de turma: Natália Luna, Joice Ferreira, Gabriel Figueiredo, Wanderley Soares e Paulo Aguiar, vocês tornaram essa experiência mais leve e tranquila. Sempre concordamos que nossos diplomas seriam compartilhados, porque ao longo de todo o curso, nos apoiamos e ajudamos sempre que foi necessário. Finalizamos essa jornada em diferentes momentos, mas vou ser sempre grata pela amizade de vocês. Muito obrigada!

À Heloísa Rodrigues, sua amizade foi de fato um presente nesses anos. Obrigada por cada palavra de apoio que traz paz, por toda atenção e cuidado!

Aos meus amigos Raphael Queiroz, Ana Carolina, Rêissa Helen e Grazielle Silva, que acompanharam meu desdobramento para conciliar trabalho e estudos, mas principalmente, me ajudaram a lidar com isso com mais tranquilidade e alegria e, muitas vezes, me ensinaram indiretamente, a reverter o estresse em descontração. Obrigada!

Gostaria também de expressar meus agradecimentos aos membros da banca: Catarina Serrão, Jéssica Prata e Glaucia Faheina, pela disponibilidade para aceitarem o convite e pela partilha de conhecimento e experiência que tanto vão contribuir com este trabalho.

Agradeço à UFPB pela estrutura e apoio financeiro que foram primordiais na minha graduação através dos projetos que participei e tanto aprendi, todos foram fundamentais para minha formação como bióloga.

RESUMO

Os equinodermos constituem um grupo de animais invertebrados emblemáticos que vivem exclusivamente em ambientes marinhos e que exercem papéis fundamentais nas comunidades bentônicas. A classe Echinoide, constituída por ouriços-mar e bolachas-da-praia, apresenta uma grande variedade de estilos de vida e características corporais adaptadas à diferentes ambientes. A persistência desses animais e existência ao longo de milhões de anos, têm sido atribuída à presença de um sistema imune (SI) inato eficiente. Esse sistema é capaz de operar de maneira uniforme contra qualquer tipo de partícula presente no meio e ingerida pelo animal, incluindo nanocontaminantes emergentes, como nanopartículas (NPs), que têm sido reportados como contaminantes críticos para os oceanos. Esses contaminantes podem ser de diferentes naturezas e podem afetar comunidades marinhas e costeiras. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo revisar os estudos que avaliaram os efeitos de nanocontaminantes no SI de equinoides, a fim de traçar um panorama do estado atual do conhecimento acerca do impacto de NPs em equinoides, visando nortear a realização de pesquisas futuras. Foram encontrados 10 artigos que avaliaram os efeitos das diferentes NPs: Nanopartículas de poliestireno funcionalizadas com grupos amina e carboxila (PS-NH₂, PS-COOH - nanoplásticos), óxidos metálicos (SnO₂, CeO₂, Fe₃O₄), óxido de zinco (ZnO), dióxido de titânio (TiO₂), NPs de ouro revestidas com polivinilpirrolidona (PVP-Au), e NPs de prata (Ag). As nanopartículas de TiO₂ foram as mais frequentes na literatura, com 4 estudos, seguidas por nanoplásticos, com 2 estudos. Nove trabalhos utilizaram a espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* e um a espécie *Strongylocentrotus droebachiensis*. Os principais efeitos encontrados nos estudos foram: alterações na atividade fagocítica/enzimática, estresse oxidativo e citotoxicidade em celomócitos, além de alterações em diferentes vias de sinalização nos organismos, impactando a saúde do animal. Os resultados encontrados são alarmantes e apontam para a necessidade de mais estudos avaliando os efeitos de nanocontaminantes no ambiente marinho envolvendo, sobretudo, outras espécies de equinoides e, principalmente, uma maior amplitude geográfica.

Palavras-chave: Nanoecotoxicologia. Ouriços-do-mar. Sistema Imune.

ABSTRACT

Echinoderms constitute a group of emblematic invertebrate animals that live exclusively in marine environments and play fundamental roles in benthic communities. The Echinoid class, composed of sea urchins and sand dollars, has a huge variety of lifestyles and body characteristics adapted to live in different types of environments. The persistence and existence of these animals over millions of years have been attributed to the presence of an efficient innate immune system. This system can operate uniformly against any type of particle in the environment and ingested by the animal, including emerging nanocontaminants. Nanoparticles (NPs) have been reported as critical contaminants in the oceans. These contaminants can be of different natures and may affect marine and coastal communities. Therefore, the aim of this study was to review the studies that have evaluated the effects of nanocontaminants on the immune system of echinoids, in order to provide an overview of the current state of knowledge about the impact of NPs on echinoids, in order to guide future research. Ten articles were found that evaluated the effects of different NPs: polystyrene nanoparticles functionalized with amine and carboxyl groups (PS-NH₂, PS-COOH - nanoplastics), metal oxides (SnO₂, CeO₂, Fe₃O₄), zinc oxide (ZnO), titanium dioxide (TiO₂), gold nanoparticles coated with polyvinylpyrrolidone (PVP-Au), and silver nanoparticles (Ag). Titanium dioxide nanoparticles were the most frequent in the literature, with 4 studies, followed by nanoplastics with 2 studies. Nine studies used the sea urchin species *Paracentrotus lividus*, and one used *Strongylocentrotus droebachiensis*. The main effects found in the studies were: changes in phagocytic/enzymatic activity, oxidative stress, and cytotoxicity in coelomocytes, as well as alterations in different signaling pathways in the organisms, impacting the animal's health. The results found are alarming and highlight the need for further studies evaluating the effects of nanocontaminants in the marine environment, especially involving other echinoid species and, most importantly, a broader geographic scope.

Keywords: Nanoecotoxicology. Sea urchin. Immune System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies representantes do Filo Echinodermata.....	19
Figura 2. Celomócitos do ouriço-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i>	24
Figura 3. Fagócitos nas formas petaloides e filopodiais.	26
Figura 4. Resposta imunológica à entrada de patógenos em <i>Arbacia lixula</i>	30
Figura 5. Nanopartículas utilizadas em diversos campos de estudo.....	32
Figura 6. Desenho esquemático do complexo Nanopartícula-Corona.....	33
Figura 7. Publicações relacionando nanocontaminantes e SI de equinoides em diferentes periódicos entre 2012 e 2024.....	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Percentual de celomócitos em diferentes espécies de equinoides.	24
Tabela 2. Características gerais dos nanocontaminantes estudados	38
Tabela 3. Efeitos de diferentes nanopartículas no SI de equinoides.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE: Acetilcolinesterase

Ag: Prata

Ag⁺: Íon Prata

AMP: Peptídeo antimicrobiano

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

ASW: Água do Mar Artificial (do inglês *artificial seawater*)

Au: Ouro

BChE: Butirilcolinesterase

Ca²⁺: Cálcio

CD14: Cluster de Diferenciação 14

CD45: Cluster de Diferenciação 45

CeO₂: Óxido de Cério

ChE: Colinesterase

CRDs: Domínios de Reconhecimento a Carboidratos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês *dynamic light scattering*)

FC: Fluido Celômico

FAS: Receptor de Morte Celular Fas

Fe₃O₄: Óxido de Ferro

FGFR2: Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblasto

GCE: Grande Corpúsculo Esférico

GP96: Proteína Regulada por Glicose 96

GRP78: Proteína Reguladora de Glicose 78

GSK3B: Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta

HSC70: Proteína Cognata de Choque Térmico 70

HSP90B1: Membro da Família Beta da Proteína de Choque Térmico 90

HSPA2: Membro 2 da Família de Proteínas de Choque Térmico A

Hsp70: Proteína de Choque Térmico 70

IL-6: Interleucina 6

MAPK: Quinase Ativada por Mitógeno

MAPK14: Quinase Ativada por Mitógeno 14

MBL: Lectina Ligadora de Manose

MP: Microplástico

MPs: Microplásticos

NLRs: Receptores do Tipo Nod

NMs: Nanomateriais

NP: Nanopartículas

NP Ag: Nanopartículas de Prata

NPs: Nanoplásticos

NTCs: Nanotubos de Carbono

PA: Poliamida

PE: Polietileno

PET: Politereftalato de Etileno

PI-Nectina: Nectina do *Paracentrotus lividus*

PMMA: Polimetilmetacrilato

PP: Polipropileno

PS: Poliestireno

PS-COOH: Nanopartículas de Poliestireno Funcionalizadas com Grupamentos

Carboxila

PS-NH₂: Nanopartículas de Poliestireno Funcionalizadas com Grupamentos Amino

PUR: Poliuretano

PVC: Cloreto de Polivinila

PVP-Au: Nanopartículas de Ouro Revestidas com Polivinilpirrolidona

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SiO₂: Dióxido de Silício

SnO₂: Dióxido de Estanho

SpC3: C3 de *Strongylocentrotus purpuratus*

SRCR: Domínio Rico em Cisteína do Receptor Scavenger

SVA: Sistema Vascular Aquífero

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês *transmission electron microscopy*)

T-AVO: TiO₂ Revestido de Sílica

TiO₂: Dióxido de Titânio

TRLs: Receptores do Tipo Toll

ZnO: Óxido de Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 Equinodermos: características, distribuição e a importância da classe	
Echinoidea	18
1.1.2 Classe Echinoidea	20
1.2 Sistema imune de equinoides	22
1.2.1 Componentes celulares.....	22
1.2.1.1 Fagócitos	25
1.2.1.2 Esferulócitos	26
1.2.1.3 Células vibráteis	27
1.2.2 Componentes humorais.....	27
1.2.2.1 Sistema complemento	27
1.2.2.2 Moléculas de adesão e Lectinas.....	28
1.2.2.3 Peptídeos antimicrobianos	28
1.2.2.4 Receptores de reconhecimento padrão	29
1.3 Os nanocontaminantes	30
1.3.1 Características e classificação	30
1.3.2 Nanocontaminantes e ecocorona.....	32
1.3.3 Nanocontaminantes e imunidade de equinoides.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Coleta de dados.....	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Caracterização das partículas.....	35
3.2 Espécies estudadas	40
3.4 Efeitos observados.....	43
3.4.1 Efeitos das NPs de óxidos metálicos.....	43

3.4.2 Efeitos das AuNPs	51
3.4.3 Efeitos dos Nanoplásticos	52
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

INTRODUÇÃO

Os equinodermos constituem um grupo de animais invertebrados emblemáticos que vivem exclusivamente em ambientes marinhos e podem ser encontrados em todas as profundidades (PECHENIK, 2016; BRUSCA et al., 2018), mas principalmente nas zonas litorâneas e sublitorâneas (MELVILLE *et al.*, 1966). São organismos predominantemente bentônicos, com poucas espécies que são pelágicas e bentopelágicas (HENDLER et al., 1995). A multiplicidade de formas do grupo carrega estratégias e adaptações únicas para sobrevivência em diversos tipos de hábitat, enquanto exercem papéis muito importantes nas comunidades bentônicas (LAWRENCE, 1987; HENDLER *et al.*, 1995).

O filo é composto por cerca de 7.000 espécies vivas e cerca de 15.000 conhecidas por registro fóssil (PAWSON, 2007; AMEMIYA; MIYAKE; RAST, 2005) que datam de 600 a 570 milhões de anos, período Cambriano, e apresentam uma grande diversidade morfológica e importância filogenética por contar a história evolutiva do grupo (ERWIN et al., 2011; SPRINKLE, 1983, 1997; BRUSCA et al., 2018).

Embora existam vários sistemas de classificação, incluindo a nova classe Concentricycloidea, proposta por Baker et al. (1986), são aceitas 5 classes existentes atualmente: Crinoidea (Lírios-do-mar); Asteroidea (Estrelas-do-mar); Ophiuroidea (Serpentes-do-mar); Holothuroidea (Pepinos-do-mar); e em especial, a classe Echinoidea, que conta com cerca de 1.000 espécies vivas e 7.000 fósseis já registrados, entre elas: ouriços-do-mar, ouriços-lápis, ouriços-coração e bolachas-da-praia (SMITH, 1984; MOOI; DAVID, 2008; BRUSCA et al., 2018; VENTURA, 2018).

A classe Echinoidea apresenta uma enorme variedade de modos de vida e espécies capazes de viver em quase todas as latitudes e profundidades (VENTURA *et al.*, 2007; BRUSCA *et al.*, 2018). A persistência desses animais em variados tipos de ambientes, além da sobrevivência e resistência ao longo de milhões de anos, tem sido atribuída a existência de um sistema imune (SI) inato eficiente (PINSINO; MATRANGA, 2015), que garantiu proteção contra diferentes patógenos que já causaram mortes de muitas espécies costeiras (SMITH et al., 2018), e que é capaz de proporcionar uma expectativa de vida de cerca de 100 anos em algumas espécies (EBERT, 1967).

No início da evolução do grupo, o conjunto de processos celulares, ou “defesa imunológica”, como denominado por Pinsino e Matranga (2015), surgiu com a resposta inata, operada por componentes celulares e um amplo repertório de moléculas de reconhecimento e produtos gênicos sensíveis ao estresse. Estes elementos são utilizados

no reconhecimento de estressores de diferentes naturezas, desde a detecção até a transformação e eliminação de materiais potencialmente danosos à saúde dos animais (MATRANGA et al., 2015).

O sistema imune dos equinodermos é complexo e sofisticado (SODERGREN et al., 2006), com um repertório amplo de genes que expressam muitas funções imunológicas observadas e células imunes (celomócitos). O sequenciamento do genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (HIBINO et al., 2006) revelou a presença de diversos genes envolvidos no sistema de defesa dos equinodermos, tais como: receptores de reconhecimento do patógeno, moléculas do sistema complemento, citocinas, fatores de transcrição e transportadores ABC (SODERGREN et al., 2006).

As respostas imunológicas desempenhadas por equinoides em resposta à infecção por bactérias, lesão e transplante, apresentam muitas características e funções celulares que são vitais para imunidade de outros deuterostômios, mas ouriços-do-mar, por exemplo, não possuem memória adaptativa (SMITH; DAVIDSON, 1992).

A resposta imunológica em equinoides, como reconhecimento e encapsulamento, orquestrados por celomócitos e moléculas presentes no fluido celômico (FC), pode operar da mesma forma com qualquer tipo de partícula presente no meio e ingerida pelo animal, seja de origem biológica ou antrópica (BORASCHI et al., 2023). Diante disso, os nanocontaminantes, como nanomateriais (NMs) (BORASCHI et al., 2023; CANESI; CORSI, 2016) ou nanoplásticos (GAMBARDELLA et al., 2016) podem se tornar um grande risco para a saúde destes animais, tendo em vista o enorme aporte de NMs e NPs nos oceanos (ANDRADY, 2015, 2017; JAMBECK, 2015). No entanto, os efeitos de nanocontaminantes sobre os organismos vivos ainda são poucos conhecidos (KLAINÉ et al., 2008; CHRISTIAN et al., 2008).

Os nanocontaminantes têm sido utilizados em diversas áreas, como biomedicina, engenharia, telecomunicações, eletrônica, transporte e outras tecnologias de fabricação (ALIJAGIC; PINSINO, 2017). Devido à escala nanométrica, os NMs, além de apresentarem condutividade elétrica, possuem propriedades mecânicas, catalíticas e ópticas únicas (KLAINÉ et al., 2008). Tais características propiciaram o crescimento exponencial de novos NMs manufaturados ou projetados ao longo da última década (KLAINÉ et al., 2008). Segundo Klaine et al. (2008), os NMs podem apresentar várias classes de compostos diferentes: óxidos metálicos, materiais semicondutores, metais de zero valência, prata e outros, além de nanopolímeros. Uma classe que têm recebido destaque são os nanoplásticos (NPs), incluindo nanoesferas, nanofibras, nanofios e

nanofolhas (KLAINÉ et al., 2008; FERREIRA et al., 2019; GONÇALVES; BEBIANNO, 2021; MARTIN et al., 2022).

Diante disso, pensando no processo de interação das nanopartículas com os organismos, os equinoides se tornam um excelente modelo para avaliar a influência desses contaminantes no sistema imune, tendo em vista sua plasticidade e resistência (PINSINO; MATRANGA, 2015), mas principalmente por exibirem como característica fisiológica um sistema vascular aquífero (SVA) aberto que permite a interação de NMs presentes na água com o fluido celômico (BORASCHI et al., 2023).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico acerca das informações disponíveis sobre as interações e efeitos de diferentes nanopartículas no sistema imune de equinoides, visando traçar o perfil do atual estado de conhecimento sobre o impacto de nanocontaminantes na saúde desses organismos de forma a nortear estudos futuros na área.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Equinodermos: características, distribuição e a importância da classe Echinoidea

Os equinodermos apresentam sistemas corporais bastante peculiares, sendo estes: plano corporal pentarradial com origem secundária; sistema interno de canais com origem celômica, relacionado com quase todas as interações dos animais; esqueleto interno formado principalmente de calcita, com um arranjo singular de placas; presença de um tecido conectivo mutável, considerado carácter diagnóstico do grupo; e hábitos de vida com grande importância ecológica (Ver Fig. 1) (BRUSCA et al., 2018; VENTURA et al., 2006; MOTOKAWA, 1984).

Os equinodermos são modelos amplamente utilizados em estudos de desenvolvimento (AMEMIYA; MIYAKE; RAST, 2005; BURKE, 2019), ecotoxicologia (MINETTO; VOLPI GHIRARDINI; LIBRALATO, 2016), biologia evolutiva (WRAY; RAFF, 1989) e imunologia (COURTNEY; DAVIDSON, 1994). São animais de fácil manutenção em laboratório e podem ser estudados a nível celular e molecular, além de se tratar de um modelo deuterostômio, cujo conhecimento pode ser estendido a outros organismos do mesmo do grupo (AMEMIYA; MIYAKE; RAST, 2005). Entre as classes que são alvo desses estudos, destaca-se a classe Echinoidea, com representantes que vêm

sendo cada vez mais utilizados em diversas áreas das ciências biológicas (DURHAM, *et al*, 1966).

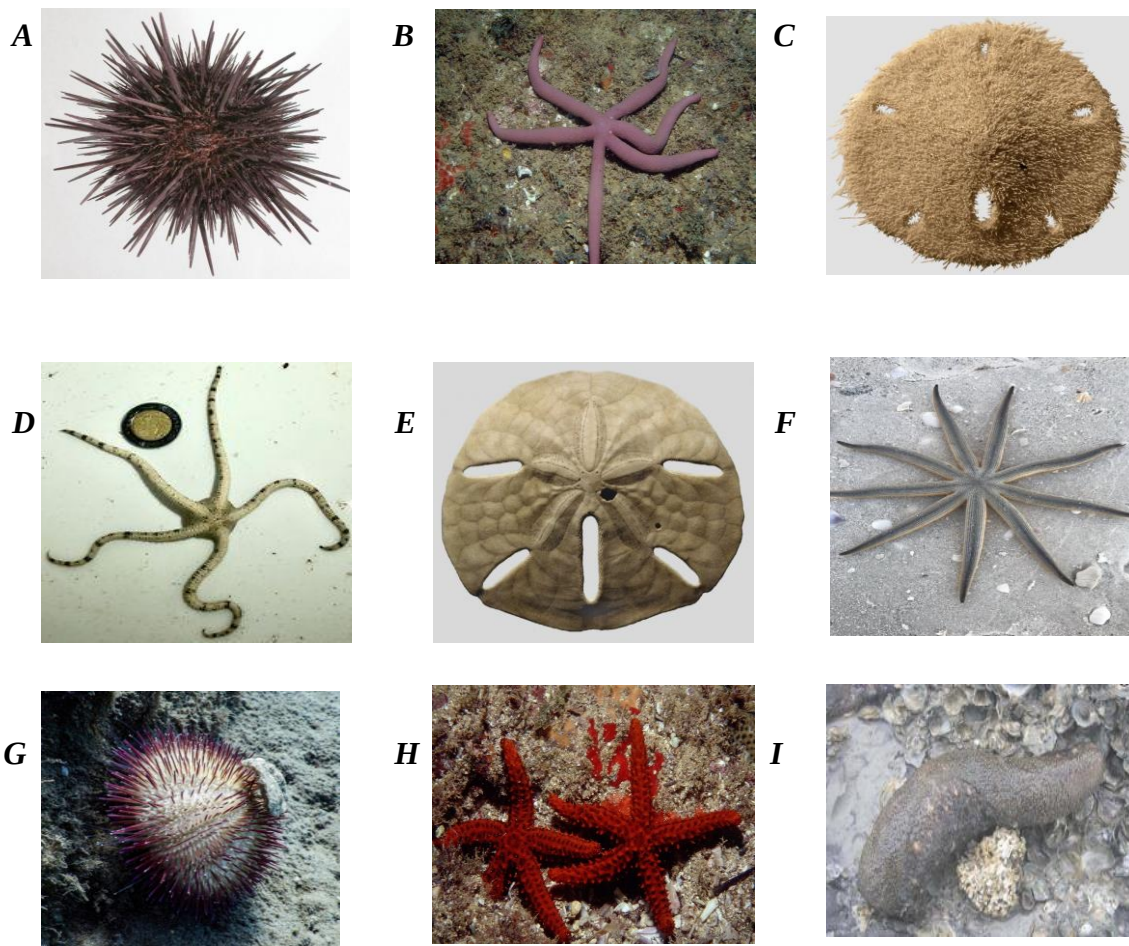


Figura 1. Espécies representantes do Filo Echinodermata. Espécies registradas por Gondim *et al.* (2008) na praia de Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba. A) *Echinometra lucunter* (Echinoidea); B) *Linckia guildingii* (Asteroidea); C) *Leodia sexiesperforata* (Echinoidea); D) *Ophioderma cinereum* (Ophiuroidea); E) *Mellita quinquesperforata* (Echinoidea); F) *Luidia senegalensis* (Asteroidea); G) *Lytechinus variegatus* (Echinoidea); H) *Echinaster echinophorus* (Asteroidea); I) *Holothuria grisea* (Holothuroidea). **Fotos:** World Register Of Marine Species (WoRMS); Foto (I) (GONDIM *et al.*, 2008).

Os equinodermos exercem papéis ecológicos muito importantes em todo ecossistema marinho, uma vez que ocupam diferentes nichos na teia trófica (LAWRENCE, 1987) e participam de interações complexas de competição e predação. O

filo representa cerca de 80% da biomassa total de fauna em zonas de alta profundidade e contribuem para o controle populacional de diversas espécies de animais e algas, assim como podem ser fonte de alimento para outras espécies (VENTURA *et al.*, 2006). Desta forma, por ocupar vários níveis tróficos, alterações na densidade populacional de equinodermos podem afetar o ecossistema (PRINCE, 1995; VENTURA *et al.*, 2006).

Os equinoides, com indivíduos adultos sésseis e larvas planctônicas, podem ser excelentes bioindicadores ambientais, predizendo a escalada da contaminação por pesticidas, metais pesados e outros poluentes emergentes. Esses contaminantes podem se acumular nas gônadas e intestino (GUILLOU; QUINIOU; HUART, 2000), afetar o desenvolvimento embrionário (TORRES-DUARTE *et al.*, 2017; TACCONI *et al.*, 2022; PALMEIRA-PINTO *et al.*, 2023), causar genotoxicidade (KUKLA *et al.*, 2022) e provocar efeitos tóxicos em vários outros sistemas (ALVES, 2018; CHIARELLI, 2019; SARLY, 2023), incluindo no sistema imune (MARQUES-SANTOS *et al.*, 2018; ALIJAGIC *et al.*, 2019, 2020, 2021; MURANO *et al.*, 2020, 2021, 2023; ZENG *et al.*, 2023).

Esses organismos desempenham funções essenciais no ecossistema marinho e são altamente sensíveis às alterações ambientais (CONTINS *et al.*, 2023). Estudos demonstram que diferentes espécies de ouriço-do-mar estão sendo gravemente impactados pelas mudanças climáticas, especialmente pelo aumento da temperatura da superfície do mar, que têm causado alta mortalidade da população (YERUHAM *et al.*, 2015) e efeitos no desenvolvimento larval (CONTINS *et al.*, 2023). Além disso, a acidificação dos oceanos, provocada pelo aumento das concentrações de CO₂, também pode afetar significativamente o desenvolvimento larval desses animais (CHAN; TONG, 2020; SARTORI *et al.*, 2023).

1.1.2 Classe Echinoidea

De acordo com Smith (1984), os equinoides são diferenciados por um conjunto de características morfológicas e filogenéticas que são encontradas isoladamente em outros grupos do filo. O autor definiu esse conjunto, sendo: 1) a forma geral do corpo; 2) o arranjo das placas da carapaça; 3) o complexo mandibular (lanterna de Aristóteles); 4) os apêndices (espinhos, pedicelárias e pódios); e 5) a posição interna do sistema hidrovascular. Melville *et al.* (1966) complementam que a boca é geralmente voltada para

o substrato, e a maioria das espécies possui até 5 gônadas localizadas em segmentos inter-radiais.

A classe Echinoidea é classificada em dois grupos morfológicos: Regulares (Ouriços) e Irregulares (Bolachas-da-praia). Essa divisão foi feita baseada na posição do ânus em relação ao sistema apical (MELVILLE *et al.*, 1966). Os equinoides adultos são organismos bentônicos. Os ouriços-do-mar se movimentam utilizando os pés ambulacrais, que garantem fixação ao substrato, e os espinhos conferem sustentação. Algumas espécies são capazes de raspar e escavar rochas com os espinhos ou com os dentes, formando canais em rochas que servem como abrigo e proteção contra predadores (DURHAM, 1966; BRUSCA *et al.*, 2018). Nesse sentido, a predação tem forte influência nesses hábitos de vida, assim como na distribuição dos organismos no ambiente (LAWRENCE; SAMMARCO, 1982).

Muitas espécies de equinoides irregulares atuais vivem enterrados em substrato arenoso. A exemplo disto, algumas espécies de *Clypeaster* e *Encope* costumam ficar enterradas entre 12 e 15 centímetros abaixo da superfície em sedimentos arenosos (DURHAM *et al.*, 1966). Para realizar esses movimentos, algumas bolachas-da-praia utilizam espinhos que se movimentam em ondas metacrônicas para cavar o fundo arenoso (DURHAM *et al.*, 1966), além de incisuras marginais na testa, denominadas lúnulas, que servem para manter a estabilidade e fixação nas correntes fortes das zonas costeiras (ALEXANDER; GHIOLD, 1980; SMITH; GHIOLD, 1982; TELFORD, 1983).

As preferências alimentares variam muito entre as espécies de equinoides e influenciam diretamente na estrutura e funcionamento da comunidade bentônica (LAWRENCE; SAMMARCO, 1982). Os equinoides podem ser herbívoros, suspensívoros, detritívoros e quase nunca predadores (BRUSCA *et al.*, 2018). De acordo com Durham *et al.* (1966), ouriços regulares se alimentam de qualquer matéria orgânica quando houver necessidade e oportunidade, enquanto cliperastoides, por possuírem sulcos alimentares bem desenvolvidos e bocas pequenas, se alimentam principalmente de detritos orgânicos, algas unicelulares e bactérias. A maioria das bolachas-da-praia são chamadas de “coletores podiais de partículas” e possuem uma lanterna de Aristóteles muito modificada, que funciona como um moinho (ELLERS; TELFORD, 1984; BRUSCA *et al.*, 2018).

Nesses animais, a cavidade celômica perivisceral e o sistema vascular aquífero, assim como em todos os equinodermos, são preenchidos pelo fluido celômico, que é semelhante à água do mar, mas com uma alta concentração de células imunes e fatores

humorais com inúmeras funções similares em outros deuterostômios (SMITH; DAVIDSON, 1992). Os equinodermos exercem um papel essencial na manutenção do ecossistema e estão expostos às pressões ambientais diversas (PINSINO; MATRANGA, 2015), que têm se intensificado atualmente, como o aumento da temperatura global e a crescente contaminação do mar por diversos poluentes, por exemplo.

1.2 Sistema imune de equinoides

Ao longo do tempo, os equinoides desenvolveram um sistema imune inato que exhibe mecanismos complexos e eficientes na defesa contra patógenos e agentes externos (SODERGREN *et al.*, 2006). O processo de resposta imune ocorre principalmente na cavidade celômica, uma estrutura essencial nos equinodermos, onde se localizam os órgãos internos, como as gônadas e o intestino dos animais, que ficam banhados no fluido celômico (FC) (PINSINO; MATRANGA, 2015; SMITH *et al.*, 2018). O líquido contém propriedades imunológicas, como as células do sistema imune (celomócitos) e moléculas antimicrobianas, que ficam imersas em um meio semelhante à água do mar, como um tecido complexo que medeia as respostas imunes (SMITH *et al.*, 2010, 2018), por meio dos processos de opsonização, coagulação, encapsulamento e fagocitose (SMITH; DAVIDSON, 1994b). A resposta imunológica que ocorre em equinodermos pode ser dividido em dois tipos: celular, mediada pelos celomócitos e caracterizada, fundamentalmente, pela fagocitose; e humoral, que envolve moléculas presentes no fluido celômico (GLIŃSKI; JAROSZ, 2000; PINSINO; MATRANGA, 2015; ZHANG *et al.*, 2019; FERNÁNDEZ-BOO *et al.*, 2018, 2024).

Os celomócitos são diversificados e extremamente abundantes em todos os equinodermos. No entanto, ainda não há uma classificação padrão para todos os equinodermos, uma vez que essas células apresentarem diferenças morfológicas, funcionais e abundância relativa entre as espécies (DEVECI; ŞENER; IZZETOĞLU, 2015).

1.2.1 Componentes celulares

Ao longo do processo evolutivo, os organismos desenvolveram barreiras físicas, como o revestimento corporal, para impedir a entrada de patógenos. Moléculas específicas passaram a reconhecer e limitar infecções na primeira interação (MATRANGA *et al.*, 2005). Em equinodermos, a resposta imune é mediada por

celomócitos que produzem fatores humorais, como sistema complemento e peptídeos antimicrobianos, que contribuem para eliminação do patógeno (SMITH *et al.*, 2010, 2018). Os celomócitos já foram estudados em todas as classes, mas a pesquisa tem-se concentrado mais nos equinoides, principalmente nos ouriços-do-mar (SMITH *et al.*, 2010). São escassos os estudos sobre o sistema imune de bolachas-da-praia, salvo estudos recentes como o de França (2023) com celomócitos da espécie *Mellita quinquiesperforata*. Ainda não se sabe ao certo a origem dos celomócitos, mas acredita-se que as células sejam produzidas pelo órgão axial (CHIA; XING, 1996) que seria a glândula linfóide dos equinoides (MILLOTT, 1969).

Ouriços-do-mar adultos apresentam quatro classes de celomócitos morfológicamente diferenciados: fagócitos (petaloides e filopodiais); esferulócitos (também chamados de amebócitos ou células mórula) vermelhos; esferulócitos incolores; e células vibráteis (SMITH *et al.*, 2010, 2; DEVECI; ŞENER; IZZETOĞLU, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2022) (ver Figura 2). Até o momento, sabe-se que algumas espécies de bolachas-da-praia também apresentam 4 classes de celomócitos: fagócitos, esferulócitos (incolores, vermelhos e amarelos), grandes corpúsculos esféricos (GCE) e células fusiformes (FRANÇA, 2023).

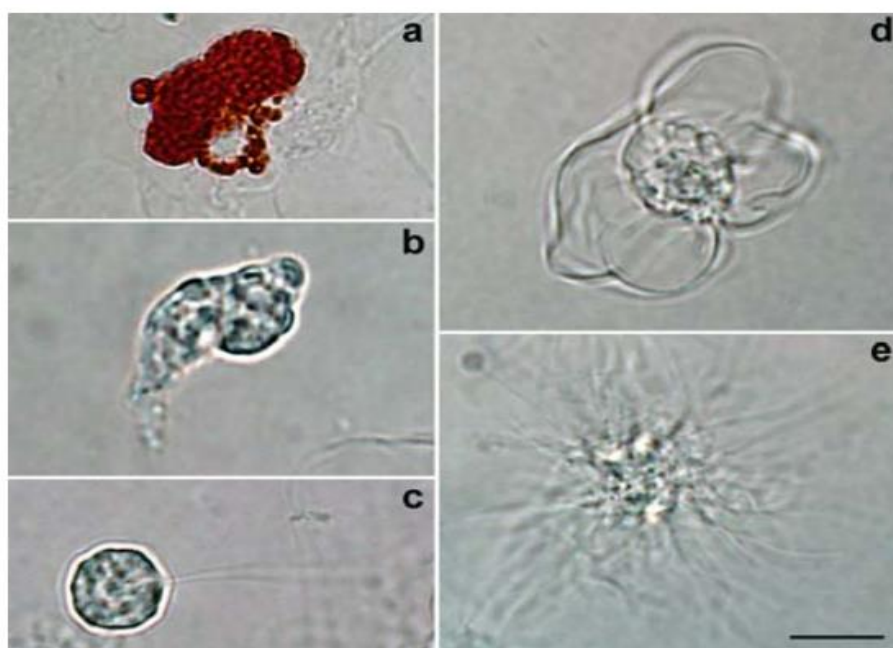


Figura 2. Celomócitos do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. a) esferulócito vermelho; b) esferulócito incolor; c) célula vibrátil; d) fagócito petaloide; e) fagócito filopodial. Barra de escala:10 µm. **Fonte:** MATRANGA et al., 2005.

As variações na distribuição celular estão relacionadas ao estado fisiológico ou imunológico do animal (XING et al., 2008). Dessa forma, a concentração de celomócitos pode ser muito variável entre espécies distintas e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (RAMÍREZ-GÓMEZ; GARCIA-ARRARÁS, 2010; DEVECI; ŞENER; IZZETOĞLU, 2015). Alguns estudos demonstram o percentual de cada subtipo de celomócito em diferentes espécies de equinoides (Tabela 1). Em algumas espécies de ouriço-do-mar, os celomócitos mais abundantes são os fagócitos, seguidos por células vibráteis, esferulócitos vermelhos e incolores (BERTHEUSSEN; SELJELID, 1978; EDDS, 1993; GROSS et al., 2000; MATRANGA et al., 2000, 2006 ; SMITH et al., 2010; MARQUES-SANTOS et al., 2017; QUEIROZ et al., 2022).

O perfil e concentração de celomócitos também podem variar diante dos impactos antrópicos e estressores ambientais. Smith et al. (2010) afirmam que o percentual de esferulócitos vermelhos, por exemplo, aumenta de 5% a 40% quando os animais foram coletados em locais poluídos. Além disso, fenômenos como variações na temperatura do mar (WILKINS et al., 2024) ou contaminação por nanopartículas (MANZO et al., 2022) podem afetar o desenvolvimento das células imunes de larvas e de organismos adultos, causando danos celulares e perda da viabilidade celular (GAMBARDELLA et al., 2016; MANZO et al., 2022).

Tabela 1. Percentual de celomócitos em diferentes espécies de equinoides.

Celomócitos	Espécie	% no Fluido Celômico	Referência
Fagócitos	<i>Mq</i>	81,12%	França, 2023
	<i>El</i>	55,80%	Marques-Santos et al., 2017
	<i>Sp</i>	40-80%	Edds, 1993; Gross et al., 2000; Smith et al., 2010
	<i>Sd</i>	67%	Bertheussen & Seljelid, 1978; Edds, 1993; Smith et al., 2010
	<i>Pl</i>	80-81,9%	Matranga et al., 2000, 2006; Arizza et al., 2007; Queiroz et al., 2022
	<i>Pg</i>	77,80%	Queiroz et al., 2022
Grande Corpúsculo Esférico	<i>Mq</i>	6%	França, 2023

Esferulócitos amarelos	<i>Mq</i>	2,14%	França, 2023
	<i>Mq</i>	7,71%	França, 2023
	<i>El</i>	2,90%	Marques-Santos <i>et al.</i> , 2017
Esferulócitos incolores	<i>Sp</i>	2,7-25%	Edds, 1993; Gross <i>et al.</i> , 2000; Smith <i>et al.</i> , 2010
	<i>Sd</i>	6,50%	Bertheussen & Seljelid, 1978; Edds, 1993; Smith <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pl</i>	5-8%	Matranga <i>et al.</i> , 2000, 2006; Arizza <i>et al.</i> , 2007; Queiroz <i>et al.</i> , 2022
	<i>Pg</i>	6,39%	Queiroz <i>et al.</i> , 2022
	<i>Mq</i>	1,96%	França, 2023
	<i>El</i>	6,50%	Marques-Santos <i>et al.</i> , 2017
Esferulócitos vermelhos	<i>Sp</i>	7-40%	Edds, 1993; Gross <i>et al.</i> , 2000; Smith <i>et al.</i> , 2010
	<i>Sd</i>	8%	Bertheussen & Seljelid, 1978; Edds, 1993; Smith <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pl</i>	4,7-5%	Matranga <i>et al.</i> , 2000, 2006; Arizza <i>et al.</i> , 2007; Queiroz <i>et al.</i> , 2022
	<i>Pg</i>	10%	Queiroz <i>et al.</i> , 2022
	<i>El</i>	34,80%	Marques-Santos <i>et al.</i> , 2017
	<i>Sp</i>	12-20%	Edds, 1993; Gross <i>et al.</i> , 2000; Smith <i>et al.</i> , 2010
Células vibráteis	<i>Sd</i>	18,50%	Bertheussen & Seljelid, 1978; Edds, 1993; Smith <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pl</i>	7,5-8%	Matranga <i>et al.</i> , 2000, 2006; Arizza <i>et al.</i> , 2007; Queiroz <i>et al.</i> , 2022
	<i>Pg</i>	5,80%	Queiroz <i>et al.</i> , 2022

Mq: *Mellita quiquiesperforata*; *El*: *Ecnometra lucunter*; *Sp*: *Strongylocentrotus purpuratus*; *Sd*: *Strongylocentrotus droebachiensis*; *Pl*: *Paracentrotus lividus*; *Pg*: *Paracentrotus gaimardi*.

1.2.1.1 Fagócitos

Os fagócitos estão envolvidos, principalmente, como o nome já diz, na fagocitose de partículas estranhas e patógenos (SMITH *et al.*, 2010). Este tipo celular representa os celomócitos mais abundantes no fluido celômico, apresentando diferentes tipos, o que faz com que tenham uma maior participação nas respostas imunes (SMITH, 1981). Os fagócitos são divididos em dois tipos: discoides (células grandes) e poligonais (células pequenas) (EDDS, 1993; SMITH *et al.*, 2010; FRANÇA, 2023). Esses dois tipos são subdivididos de acordo com a conformação celular: petaloides e filopodiais (FRANÇA, 2023). Quando estão em suspensão, as células se apresentam na forma petaloide (SMITH

et al., 2010), envolvidos na migração para os locais das lesões, enquanto o estágio filopodial pode estar envolvido na coagulação (Ver Figura 3) (MATRANGA *et al.*, 2005).

O processo de encapsulamento é possivelmente operado em conjunto com os esferulócitos incolores, os quais liberam as substâncias citotóxicas (ARIZZA *et al.*, 2007; QUEIROZ; CUSTÓDIO, 2015; ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2021; BORASCHI *et al.*, 2023). Essa colaboração ocorre porque devido à grande quantidade de fagócitos no fluido e à alta capacidade de alterar sua forma citoplasmática, os fagócitos são capazes de formar coágulos que levam à formação de agregados celulares com outros tipos de celomócitos que contribuem no processo (MATRANGA *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2018).

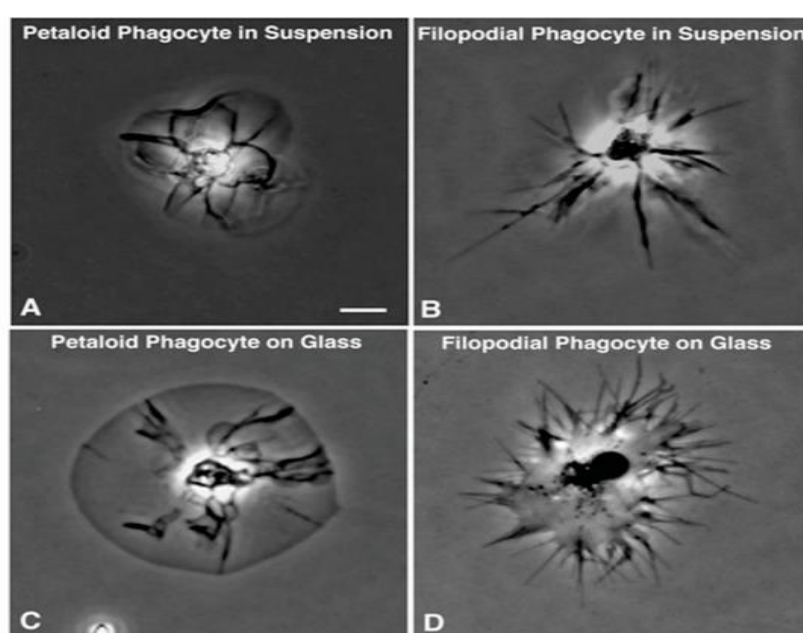


Figura 3. Fagócitos nas formas petaloides e filopodiais. A mudança ocorreu durante o processo de coagulação. A) Fagócito petaloide em suspensão; B) Fagócito filopodial em suspensão; C) Fagócito petaloide aderido à lâmina; D) Fagócito filopodial aderido à lâmina. **Fonte:** SMITH *et al.*, 2010.

1.2.1.2 Esferulócitos

O esferulócitos vermelhos possuem grânulos vermelhos ricos em equinocromo A, uma naftoquinona que possui propriedades antibacterianas (SERVICE; WARDLAWT, 1984). Estas células exibem motilidade ameboide que é proporcionada pela dinâmica dos filamentos de actina (SMITH *et al.*, 2010; BRANCO; FIGUEIREDO; SILVA, 2014) Na presença de bactérias, as células migram e cercam o local da infecção, sendo capazes de

encapsular partículas estranhas e realizar degranulação (JOHNSON, 1969; SMITH *et al.*, 2010; BRANCO; FIGUEIREDO; SILVA, 2014) (Ver Figura 4).

O esferulócitos incolores também possuem grânulos, mas sua função ainda não é muito conhecida (SMITH *et al.*, 2010). No entanto, Arizza *et al.* (2007), sugerem para esse tipo celular uma possível atividade citolítica, que é facilitada pela presença de outros celomócitos, como os fagócitos. Devido a forma característica de locomoção dos dois tipos de esferulócitos, as células sofrem mudanças corporais muito rápidas e por isso conseguem se mover rapidamente no fluido (MATRANGA *et al.*, 2005).

1.2.1.3 Células vibráteis

Células vibráteis são células esféricas que contêm pequenos grânulos e um flagelo único que permite a movimentação em linha reta ao longo de uma espiral helicoidal (MATRANGA *et al.*, 2005). Essa característica possibilita que a célula se movimente mais rapidamente (MATRANGA *et al.*, 2005; PINSINO; MATRANGA, 2015). Sua função ainda está sendo estudada, mas sabe-se que a exocitose dos seus grânulos pode desencadear uma reação de coagulação, além de ter uma importante função na homeostase (SMITH *et al.*, 2010, 2018).

1.2.2 Componentes humorais

1.2.2.1 Sistema complemento

O sistema complemento é um sistema ancestral que têm sido conservado ao longo da evolução do grupo (CLOW; TERWILLIGER; SMITH, 2001). É um complexo de proteínas séricas que são ativadas em cascata que levam à opsonização de partículas estranhas e ativação de diferentes funções do sistema imune (HO; RAST, 2016). Os equinodermos compartilham muitas características do sistema complemento com vertebrados. No entanto, não apresentam a via clássica justamente porque não possuem um sistema adaptativo (MATRANGA *et al.*, 2005). Nesse sentido, Smith *et al.* (2001), e posteriormente Hibino *et al.* (2006), identificaram no genoma de *Strongylocentrotus purpuratus* sequências homólogas à proteína C3 do sistema complemento, presente em vertebrados, além do fator B, conhecido como SpC3 e SpBf. O SpC3 apresenta características de tioéster e por isso formam ligações covalentes com as moléculas alvo,

atuando como opsonina (SMITH *et al.*, 2010) e marcando os alvos para ingestão pelos fagócitos poligonais (CLOW *et al.*, 2004; HO; RAST, 2016).

1.2.2.2 Moléculas de adesão e Lectinas

Lectinas formam um grande grupo de proteínas e glicoproteínas que podem ser solúveis ou integrais de membrana, contendo pelo menos dois domínios de reconhecimento de carboidrato (CRDs, do inglês *carbohydrate recognition domains*), e que podem causar aglutinação de células (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). As lectinas apresentam importantes funções em equinodermos, principalmente no reconhecimento de células não-próprias (SMITH *et al.*, 2010). No genoma de ouriço-do-mar já foram identificadas dois tipos de lectina: lectina ligadora de manose (MBL) e ficolinas (HIBINO *et al.*, 2006).

Muitas lectinas atuam como opsoninas e aglutininas devido a sua capacidade de se ligar a carboidratos presentes na superfície de patógenos (SMITH *et al.*, 2018). Nesse sentido, as lectinas são moléculas-chave na resposta imune porque exercem um papel ativo no recrutamento dos celomócitos no organismo hospedeiro (SMITH *et al.*, 2010).

Durante o processo de eliminação de um microrganismo, dois mecanismos atuam em conjuntos: moléculas envolvidas na adesão entre as células cercam e encapsulam o alvo, enquanto outras, como as perforinas (GLINSKI; JAROSZ, 2000) promovem a formação de poros na membrana plasmática, ocasionando lise celular. Outra proteína importante no processo de agregação, é amassina, uma proteína que forma pontes dissulfeto, e que promove a agregação de celomócitos durante a coagulação (HILLIER; VACQUIER, 2003; HILLIER; MOY; VACQUIER, 2007).

1.2.2.3 Peptídeos antimicrobianos

Segundo Smith e colaboradores (2010, 2018), peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são moléculas efetoras da imunidade inata que promovem lise celular em microorganismos. São encontrados em uma grande variedade de sequências e estruturas, mas possuem características e funções semelhantes (SMITH *et al.*, 2010). Em equinoides, as principais famílias de AMPs são: AMPs ricos em cisteínas (strongylocinas) e AMPs heterodiméricos (centrocinas). Essas famílias estão presentes tanto em adultos quanto em larvas, exercendo um papel importante para a

imunidade inata (LI et al., 2015), pois apresentam um amplo espectro de resposta imune contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (HO; RAST, 2016).

1.2.2.4 Receptores de reconhecimento padrão

Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) são proteínas do sistema imune que identificam padrões moleculares conservados em patógenos e nas células do hospedeiro, desencadeando respostas imunes (GORDON, 2002; ISAZADEH et al., 2023).

Hibino et al. (2006), ao avaliarem o genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*, identificaram genes que codificam famílias de proteínas homólogas aos receptores de reconhecimento padrão, que ocorrem em vertebrados. Esses receptores são: Receptores do tipo Toll (TRLs, do inglês *Toll-Like Receptor*), Receptores do tipo Nod (NLRs, do inglês *Nod-Like Receptor*) e domínio rico em cisteína do receptor Scavenger (SRCR, do inglês *Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain*). Foram encontrados mais de 200 genes codificando TRLs no genoma do *S. purpuratus*, com uma maior expressão em celomócitos, mas também presentes na parede intestinal (HIBINO et al., 2006). Segundo Smith et al. (2010), muitas famílias do receptor são expressas em larvas, mas não foram detectadas nos embriões de ouriços.

No genoma do *S. purpuratus* também estão presentes mais de 220 genes codificantes dos NLRs, que se mostram mais diversos que os TRLs, mas são mais expressos no intestino. Sua função no sistema imune de equinoides ainda não é bem conhecida (HIBINO et al., 2006), mas parecem estar envolvidos na manutenção da microbiota intestinal (SMITH et al., 2010). São codificados mais de 1.000 domínios ricos em cisteína do receptor Scavenger (SRCR) em aproximadamente 180 genes existentes no genoma do *S. purpuratus*, o que ultrapassa o número de genes desse receptor já descritos em outras espécies (HIBINO et al., 2006).

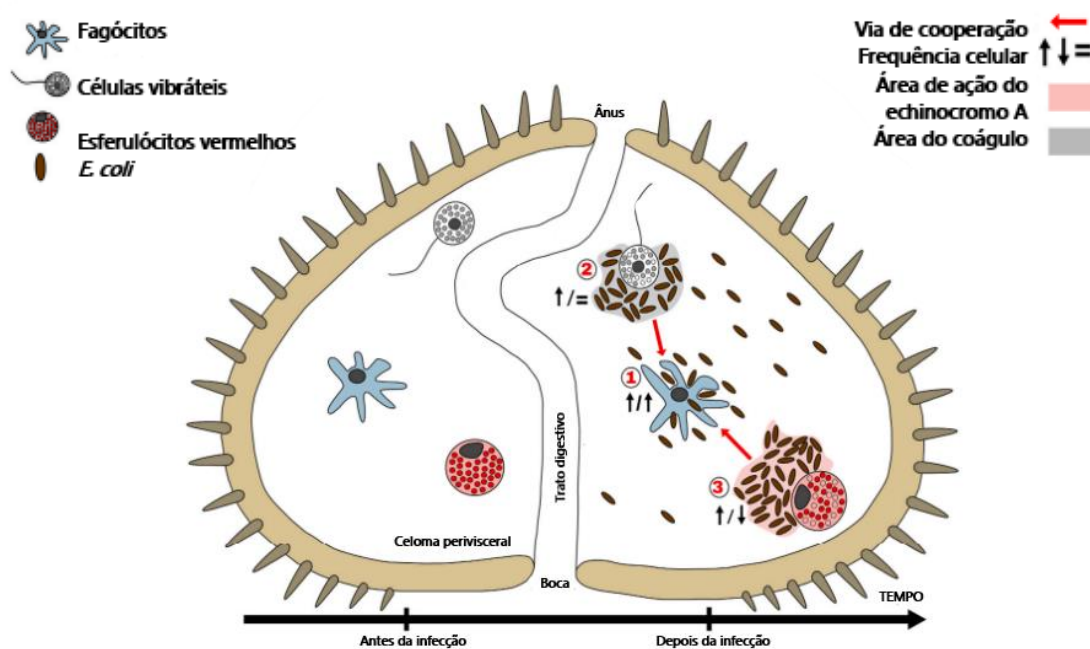


Figura 4. Resposta imunológica à entrada de patógenos em *Arbacia lixula*. 1) Fagócitos removem células bacterianas e restos celulares; 2) Degranulação de células vibráteis no material estranho promovendo a coagulação; 3) Esferulócitos vermelhos impedindo o crescimento bacteriano através da liberação de Echinocromo A. **Fonte:** QUEIROZ et al., 2021.

1.3 Os nanocontaminantes

1.3.1 Características e classificação

Naturalmente as nanopartículas estão presentes no ambiente sendo provenientes da erosão de materiais rochosos, explosões vulcânicas ou de outras fontes naturais. Estão presentes no ar, no solo e na água (GAMBARDELLA, 2014). No entanto, o aumento da entrada de NPs de origem antrópica, como fumaça, atividades de mineração, construção ou outros processos tecnológicos, aliada principalmente à entrada de nanopartículas projetadas, é o que apresenta mais riscos para os ecossistemas naturais (GAMBARDELLA, 2014). A produção acelerada de NPs é alavancada principalmente pela alta demanda de novas nanotecnologias em diversos campos (CHRISTIAN et al., 2008; GAMBARDELLA, 2014). De acordo com a comissão europeia (2011), as NPs foram nomeadas assim devido ao seu tamanho, menor que 1000 nm, e de acordo com sua natureza (COMISSÃO EUROPEIA, 2011).

Nos ambientes aquáticos e no solo, as NPs formam sistemas coloidais, constituídos por misturas de compostos dispersos e dispersantes (CHRISTIAN et al., 2008). Christian e colaboradores (2008) os caracteriza em quatro diferentes grupos de acordo com a composição e origem: coloides naturais orgânicos e inorgânicos; antropogênicos; e NPs projetadas. Esses grupos apresentam uma leve variação de tamanho (LEAD; WILKINSON, 2006), entre 1 nm e 1 μ m (KLAINÉ, 2008). Dentre as nanopartículas, as NPs projetadas representam um maior risco ao ambiente devido às suas propriedades físico-químicas e capacidade de interagir com os sistemas biológicos (BARBERO et al., 2017).

Klaine (2008) define cinco classes de NPs projetadas que são principalmente produzidas: 1) Nanotubos de carbono (NTCs), que se originou com a descoberta em 1985 do primeiro fulereno (KROTO et al, 1985), uma nanomolécula esférica formada por 60 átomos de carbono, que é produzida pela evaporação do grafite. São usados em plástico e em baterias e apresentam altos riscos de causar efeitos adversos no ambiente; 2) Óxidos metálicos, que são utilizadas em diversas aplicações, inclusive em cosméticos e protetor solar, sendo o dióxido de titânio (TiO₂) e o óxido de zinco (ZnO) as NPs mais utilizadas devido às suas propriedades fotolíticas; 3) Pontos quânticos, que são NPs de carbono fotoluminescentes (WANG et al., 2019), utilizadas em diversas em aplicações médicas; 4) Metais de zero valência, que são NPs de prata (Ag) aplicados em creme dental, produtos para bebê, entre diversos produtos; e ouro (Au) ou coloides de ouro com aplicações médicas; 5) Dendrímeros, polímeros multifuncionais utilizados em diversos campos da biologia molecular (KLAINÉ, 2008). Além disso, Alcalá-Alcalá e Quintanar-Guerrero (2014) apontam outras nanopartículas muito utilizadas na medicina, como as micelas poliméricas e NPs poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas). Partículas já mencionadas anteriormente, como ouro, prata e óxido de silício também são conhecidas como NPs magnéticas (ALCALÁ-ALCALÁ; QUINTANAR-GUERRERO, 2014) (Ver Figura 4).

A composição da superfície da NPs está diretamente relacionada com a sua aplicação final, e para interagir com sistemas biológicos, as NPs devem ter grupos funcionais adequados presentes em sua superfície (CHRISTIAN, 2008). Segundo o autor, o esforço na preparação das NPs é necessário quando se pensa que muitas NPs perdem suas propriedades únicas depois que agregam e precipitam no meio. A funcionalização correta é necessária para que as partículas fiquem suspensas e se dispersem facilmente no meio escolhido (CHRISTIAN, 2008). Entretanto, todas as características que afetam a

interação das partículas com o meio, podem resultar no seu destino e em toxicidade (KLAINÉ, 2008). Outros fatores também podem contribuir para a agregação e dispersão das partículas, como pH, força iônica (osmolaridade) e a presença de matéria orgânica natural (MON) (CORSI et al., 2014).

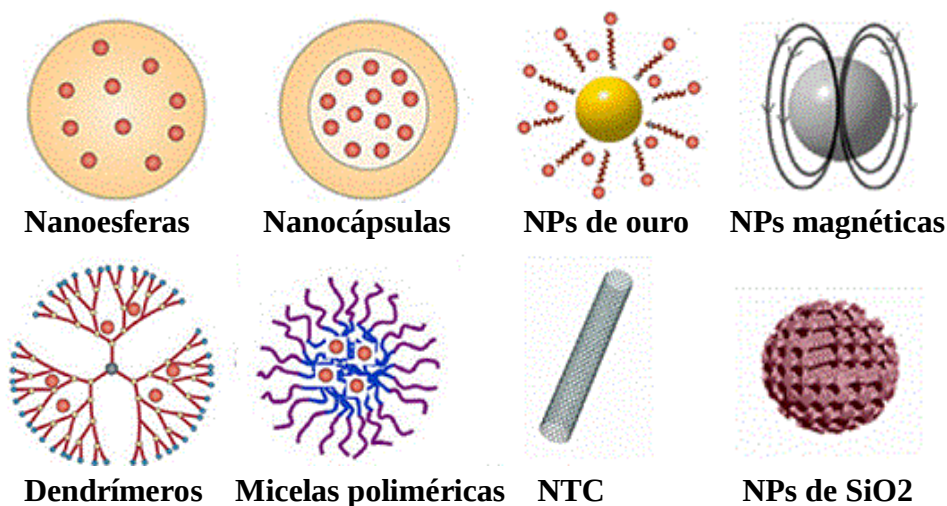


Figura 5. Nanopartículas utilizadas em diversos campos de estudo. NPs: nanopartículas; NTC: Nanotubo de carbono; SiO₂: Dióxido de silício. **Fonte:** adaptado de Alcala-Alcala e Quintanar-Guerrero, 2014.

1.3.2 Nanocontaminantes e ecocorona

As NPs presentes em um meio de cultura podem formar aglomerados com as proteínas séricas do meio, formando complexos NP-Corona, que pode influenciar positivamente a persistência, biodistribuição e biocompatibilidade das partículas com células e tecidos (CASALS *et al.*, 2010). As proteínas podem formar dois complexos diferentes: a “coroa dura”, formada por proteínas que se aderem fortemente à NP e permanecem ligadas enquanto esta se movimenta entre os compartimentos; a “coroa suave”, formada por proteínas fracamente ligadas, que ficam em troca dinâmica com o ambiente (WALCZYK *et al.*, 2010) (Ver Figura 6).

Sabe-se que aproximadamente 125 proteínas ligam-se seletivamente às superfícies das partículas, e estas nem sempre são as mais abundantes no meio (GALLOWAY; COLE; LEWIS, 2017). É importante mencionar também que a “coroa” também pode ser formada por carboidratos que tendem ser multivalente, por isso, atuam envolvendo a superfície da nanopartícula com múltiplos receptores na superfície celular, melhorando ou inibindo sua internalização nas células (LUNDQUIST; TOONE, 2002).

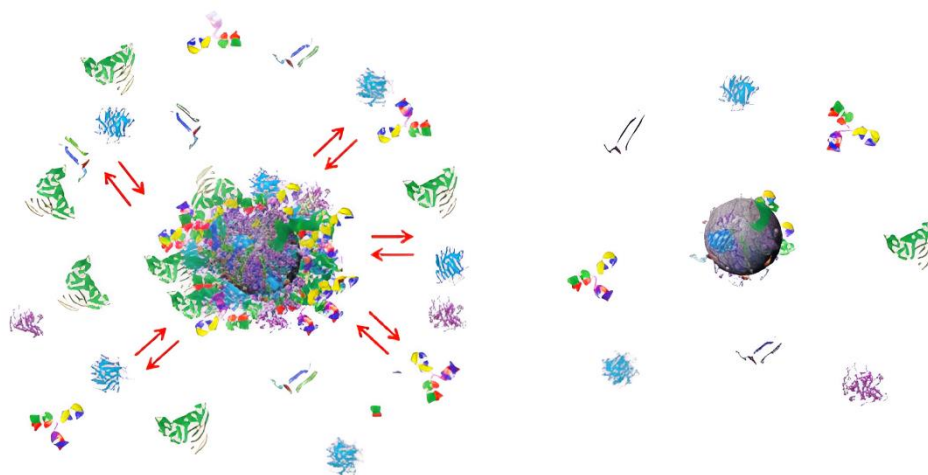


Figura 6. Desenho esquemático do complexo Nanopartícula-Corona. NP envolvida por proteínas que são trocadas rapidamente (Esquerda) e proteínas fortemente ligadas (Direita). **Fonte:** WALCZYK *et al.*, 2010.

Estudos envolvendo partículas funcionalizadas, como NPs de PS ($-NH_2$, $COOH$), mostraram que as NPs requerem a formação de um complexo proteico ao seu redor com proteínas derivadas do meio circundante (WALCZYK *et al.*, 2010). Posteriormente, a formação desse complexo foi registrado em invertebrados terrestres e aquáticos (HAYASHI *et al.*, 2013), bem como no ouriço-do-mar *P. lividus*, perante à exposição por NPs de PS- NH_2 (MARQUES-SANTOS *et al.*, 2018). Todavia, é consensual que o principal papel das proteínas coronas na interação célula-NP é influenciar o reconhecimento celular, captação, depuração e toxicidade (FLEISCHER; PAYNE, 2014).

1.3.3 Nanocontaminantes e imunidade de equinóides

Evidências recentes sugerem que o sistema imunológico dos invertebrados

marinhos é um alvo importante dos efeitos das nanopartículas (NPs). Esses organismos são considerados modelos ideais para estudos ambientais, pois ao longo da evolução, preservaram diversas características imunológicas semelhantes às dos vertebrados (SMITH *et al.*, 2010; 2018), e principalmente porque possuem um sistema vascular aquífero aberto que permite a interação com partículas presentes no meio (BORASCHI *et al.*, 2023). Por isso, eles representam um modelo valioso para avaliar os impactos ambientais causados pelas NPs (CANESI; PROCHÁZKOVÁ, 2013; CANESI; CORSI, 2016).

Naturalmente o sistema imune funciona em nanoescala, de forma que as células do sistema imunológico inato interagem com partículas estranhas, incluindo NPs, que estão dentro da faixa de tamanho dos vírus, que são reconhecidos pelas células do sistema imunológico (BARBERO *et al.*, 2017). É esperado que as NPs sejam reconhecidas como material estranho pelo sistema imunológico inato dos animais (BARBERO *et al.*, 2017). De qualquer forma, os nanomateriais podem interagir com o sistema imunológico de várias maneiras, melhorando ou suprimindo suas funções (SMITH *et al.*, 2014).

Muitos estudos avaliaram os efeitos de diferentes NPs, como nanopartículas de prata (AgNPs), ouro (AuNPs) e dióxido de titânio (TiO₂ NPs) no sistema imune de invertebrados marinhos, como moluscos (ABBOTT CHALEW; GALLOWAY; GRACZYK, 2012; MARISA *et al.*, 2015), e crustáceos (LI *et al.*, 2018; MEHENNAOUI *et al.*, 2018). Nesse sentido, os estudos com sistema imune são conduzidos com organismos de quase todas as classes de equinodermos, como pepinos-do-mar (PLEE; POMORY, 2020) e estrelas-do-mar (BECK; HABICHT, 1986), mas a linha de pesquisa concentra-se principalmente na classe Echinoidea.

É crescente preocupação com a presença de nanocontaminantes no meio ambiente e seus potenciais impactos sobre a saúde dos organismos marinhos (FERREIRA *et al.*, 2019; ZAKI; ARIS, 2022) e consequentemente na saúde humana (LAI *et al.*, 2022). Tendo em vista esses fatores, torna-se essencial compreender como os nanocontaminantes podem afetar o sistema imunológico de equinoides, já que são animais reconhecidos como bioindicadores de riscos ambientais (PINSINO; MATRANGA, 2015; PINSINO *et al.*, 2015; GAMBARDELLA *et al.*, 2021) e por apresentam características imunológicas semelhantes aos vertebrados (SMITH *et al.*, 2010, 2018).

A investigação dos efeitos dos nanocontaminantes nos equinoides é fundamental não apenas para compreender as respostas imunológicas desses organismos, mas também para avaliar os impactos em níveis superiores da teia trófica. Dessa forma, esses estudos

contribuem para uma compreensão mais abrangente das consequências ambientais dos nanocontaminantes. Logo, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os efeitos dos nanocontaminantes no sistema imunológico de equinoides. A pesquisa se propôs a analisar o conhecimento existente acerca da interação entre nanocontaminantes e o SI, contribuindo para o avanço das investigações nessa área e para a compreensão dos riscos ambientais associados aos poluentes emergentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de dados

Para a realização desta revisão bibliográfica acerca dos dados existentes na literatura sobre os efeitos de nanocontaminantes no sistema imune de equinoides, foi feito um levantamento bibliográfico nas bases de dados ScienceDirect, PubMed, SciELO e Google Scholar. É importante mencionar que alguns trabalhos clássicos não foram encontrados nessas bases, mas sim na plataforma ResearchGate. A pesquisa foi feita utilizando as seguintes palavras-chave: *Phylum Echinodermata*, *Echinoderm*, *Echinoidea*, *Sea Urchin*, *Sand Dollar*, além de combinações de palavras-chave focadas em especificar o tema: “*Echinoderm + immune system*”, “*Echinoidea + immunity*”, “*Sea urchin + immunity*”, “*Sand dollar + celomocytes*”, “*Sea urchin + celomocytes*”, “*Sea urchin + immunity + nanoparticles/Nanomaterials/ Nanoplastics/Nanocontaminants*”.b

Após a busca, os trabalhos foram pré-selecionados perante a leitura dos resumos. Não houve critério de escolha com base no ano de publicação, logo, foram selecionados todos os trabalhos que se encaixam no tema abordado. A partir do levantamento, os trabalhos foram categorizados em uma planilha de acordo com os seguintes tópicos: 1) Espécie; 2) Nanopartícula estudada; 3) Efeito observado; 4) Via ou molécula enfatizada; 5) Características das partículas; 6) Referências. Os dados foram coletados e elencados dessa forma para posterior reorganização em duas tabelas que serão apresentadas e utilizadas para discussão dos resultados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das partículas

Foram encontrados 10 artigos que avaliaram os efeitos de diferentes nanopartículas entre os anos de 2012 e 2024 (Ver Figura 7). Os trabalhos analisados investigaram 7 tipos de nanopartículas: NPs de poliestireno funcionalizados com grupamentos carboxila ou amino (PS-COOH e PS-NH₂, respectivamente – 2 estudos) (MARQUES-SANTOS *et al.*, 2018; MURANO *et al.*, 2021), óxidos metálicos (SnO₂, CeO₂, Fe₃O₄ - 1 estudo) (FALUGI *et al.*, 2012), óxido de zinco (ZnO - 1 estudo) (MANZO *et al.*, 2017), dióxido de titânio (TiO₂ - 4 estudos) (PINSINO *et al.*, 2015b; ALIJAGIC *et al.*, 2019, 2020; CATALANO *et al.*, 2020), NPs de ouro revestidas com polivinilpirrolidona (PVP-Au - 1 estudo) (ALIJAGIC *et al.*, 2021), e NPs de prata (Ag - 1 estudo) (MAGESKY *et al.*, 2017).

O TiO₂ é uma das nanopartículas mais estudadas na pesquisa de nanosegurança (CATALANO *et al.*, 2020), e isso se reflete nos resultados dessa pesquisa, onde até o ano de 2023, os trabalhos avaliando NPs de TiO₂ se tornaram os mais recorrentes com 4 artigos publicados (Ver Figura 7).

Os estudos com nanopartículas plásticas começaram a entrar em evidência a partir de 2014, com estudos de embriotoxicidade em ouriços-do-mar (DELLA TORRE, 2014), com moluscos (CANESI *et al.*, 2015), microcrustáceos (BERGAMI *et al.*, 2016b), até peixe-zebra (CHEN *et al.*, 2017). No entanto, durante esse período o plástico só foi investigado pela primeira vez, no contexto de investigação dos efeitos no SI de equinoides, por Marques-Santos *et al.* (2018) que contribuíram com informações e direcionamentos importantes na avaliação de riscos de PS-NPs, estudada posteriormente também por Murano e colaboradores (2021).

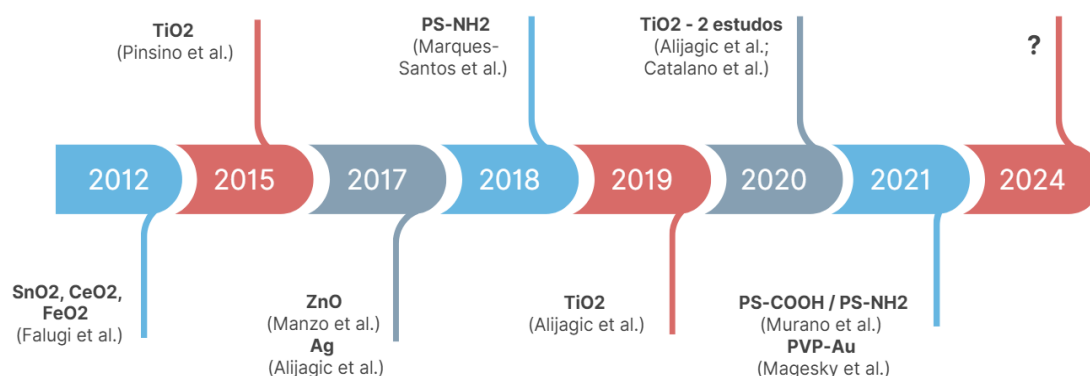


Figura 7. Publicações relacionando nanocontaminantes e SI de equinoides em diferentes periódicos entre 2012 e 2024. Dez publicações que abordam diferentes NPs no sistema

imune de equinoides.

Os tamanhos das nanopartículas variam amplamente entre os estudos, refletindo a diversidade dos materiais, indo de 8 a 105 nm (Ver Tabela 2). As nanopartículas de SnO₂, CeO₂ e Fe₃O₄ em Falugi *et al.* (2012) apresentam tamanhos de 61 nm, 50-105 nm e 20-30 nm, respectivamente, ZnO (14-100 nm), enquanto as AgNPs de Magesky *et al.* (2017) variam de 8-15 nm em estado individual e 40-80 nm quando aglomeradas. Nanopartículas de TiO₂ aparecem tamanhos que variam de 10-65 nm (PINSINO *et al.*, 2015; ALIJAGIC *et al.*, 2019), e valores fixos de 21 nm em outros estudos (ALIJAGIC *et al.*, 2020; CATALANO *et al.*, 2020). As partículas plásticas como PS-NH₂ e PS-COOH apresentaram tamanhos entre 50 e 60nm.

A funcionalização das partículas foi mencionada em 3 estudos (Ver Tabela 2). As partículas de poliestireno podem ser funcionalizadas com grupos amina e carboxila, sendo definidas como catiônicas (-NH₂) e aniônicas (-COOH), respectivamente (CASADO *et al.*, 2013). Esses grupos são adicionados à superfície das NPs para aumentar sua solubilidade e reatividade em meio aquoso, facilitando a interação com moléculas biológicas (CHRISTIAN, 2008). Nanopartículas de ouro (AuNPs) foram funcionalizadas com polivinilpirrolidona (PVP), um polímero comumente utilizado para estabilizar NPs em suspensão, evitando a aglomeração das partículas e reduzindo a toxicidade das partículas (FRANCO; DE MARCO, 2020). Quando funcionalizadas, essas partículas se ligam mais facilmente às moléculas orgânicas (CARNOVALE *et al.*, 2019).

Quanto à preparação das suspensões, foram descritos dois principais parâmetros: o meio de suspensão e o método mecânico. O meio mais utilizado foi a água milli-Q (4 estudos), também chamada água ultrapura ou deionizada em alguns trabalhos. Em seguida foram ASW (água do mar artificial, do inglês “*artificial sea water*”) (1 estudo) e NSW (água do mar natural, do inglês “*natural sea water*”) (1 estudo). Cinco estudos não informaram o meio de suspensão. E com relação ao método de suspensão mecânica, foram descritas duas formas: uso apenas do vórtex (5 estudos) e apenas sonicação (1 estudo). O tempo descrito agitação no vórtex foi de 3 minutos (1 estudo), 5 minutos (1 estudo) e 10 minutos (1 estudo). Cinco trabalhos não descreveram o método de suspensão mecânica. Ainda, 3 trabalhos não descreveram a forma de preparação das suspensões (Tabela 2).

Foram utilizadas 2 diferentes técnicas para caracterização das nanopartículas, são

elas: espalhamento dinâmico de luz (DLS) (2 estudos) e microscopia eletrônica (ME) (incluindo SEM, HR-SEM e TEM) (7 estudos). Três estudos utilizaram duas técnicas no processo de caracterização. Três trabalhos não mencionaram as técnicas de caracterização das partículas. A técnica DLS mede o diâmetro hidrodinâmico das NPs, não fornecendo o tamanho real das partículas. Em contraponto, a ME consegue determinar o tamanho e a forma do núcleo das partículas, mas não informa sobre o comportamento das NPs em solução. Por esse motivo, as técnicas de DLS e EM precisam estar em conjunto para confirmar as propriedades físico-químicas das NPs (GANGADOO et al., 2020).

A caracterização adequada das NPs é crucial para garantir dados confiáveis e com alta aplicabilidade. Essa necessidade se intensifica devido às preocupações de segurança frequentemente associadas às propriedades físicas e químicas das NPs (BHATTACHARJEE, 2016). De acordo com Serrão e Marques-Santos (2023), para caracterizar nanopartículas geralmente são utilizadas as técnicas de DLS e ME.

As concentrações das suspensões das partículas testadas foram expressas de 4 formas diversas: g/L (1 estudo), µg/mL (6 estudos), µg/L (1 estudo), mg Zn/kg (1 estudo), partículas/L (1 estudo). Na segunda unidade, com mais estudos, a faixa de concentração foi de 0.1 a 100 µg/mL. As diferenças nas unidades utilizadas dificultam a comparação direta entre os estudos, é importante ressaltar que, nesse caso, a interpretação das concentrações pode variar dependendo do contexto em que a unidade é aplicada (CASADO et al, 2013; WAN et al., 2018). Ao se depararem com discrepâncias na forma com que as concentrações eram definidas, Wan et al. (2018) enfatizam a necessidade de padronizar uma unidade de medida para facilitar a comparação dos estudos.

Muitos estudos têm utilizado concentrações significativamente maiores do que os níveis encontrados na natureza (CATALANO *et al.*, 2020). Essas concentrações mais elevadas visam maximizar os efeitos e respostas dos organismos, propiciando uma compreensão dos potenciais impactos (MURANO *et al.*, 20121). No entanto, Murano *et al.* (2021) apontam a necessidade de entender melhor os efeitos desses contaminantes na natureza em concentrações realistas. Alguns estudos, como Manzo *et al.*, (2017) simulam concentrações realistas, o que é fundamental para gerar dados mais aplicáveis e para entender os impactos reais das NPs no ambiente marinho, além de evitar superestimções de toxicidade que podem ocorrer em concentrações muito altas e irreais.

Tabela 2. Características gerais dos nanocontaminantes estudados

Referência	NPs	Tamanho	Preparação	Caracterização	Concentrações
Falugi <i>et al.</i> , 2012	CeO ₂ , Fe ₃ O ₄ SnO ₂	61 nm (SnO ₂), 50-105 nm (CeO ₂), 20-30 nm (Fe ₃ O ₄)	Vórtex	SEM	10 ⁻² ; 10 ⁻⁴ g/L
Pinsino <i>et al.</i> , 2015	TiO ₂	10-65 nm	ASW	TEM/DLS	1–5 µg/ml
Magesky <i>et al.</i> , 2017	Ag	Individual (8-15 nm); Aglomerados (40-80 nm)	Água Milli-Q	TEM	500 µg/L a 20 µg/L
Manzo <i>et al.</i> , 2017	ZnO	100 nm e 14 nm	-	-	1; 10 mg Zn/kg de alimento
Marques-Santos <i>et al.</i> , 2018	PS- NH ₂	50 nm	NSW Vórtex	TEM	1, 5, 10, 25 µg/ mL
Alijagic <i>et al.</i> , 2019	TiO ₂	10-65 nm	Água ultrapura Vórtex (5min)	TEM/DLS	0.1, 1, 10, 100 µg/mL
Alijagic <i>et al.</i> , 2020	TiO ₂	21 nm	Água ultrapura Vórtex	-	1 µg/mL
Catalano <i>et al.</i> , 2020	TiO ₂	21 nm	Vórtex (10 min)	HR-SEM/ DLS	0.1, 1, 10, 100, 500 mg/L
Alijagic <i>et al.</i> , 2021	PVP– Au	-	-	SEM	0.1 µg/mL
Murano <i>et al.</i> , 2021	PS- COOH e PS- NH ₂	60 nm	Água milli-Q Sonicção (3 min)	-	25 mg/mL

NPs (nanopartículas); SEM (microscopia eletrônica de varredura); TEM (microscopia eletrônica de transmissão); DLS (espalhamento dinâmico de luz); HR-SEM (microscopia eletrônica de alta resolução); PS-COOH (NPs de poliestireno funcionalizadas com grupamentos carboxila); PS-NH₂ (NPs de poliestireno funcionalizadas com grupamentos amino); SnO₂ (Dióxido de estanho); CeO₂ (Dióxido de cério); Fe₃O₄ (Óxido de ferro); ZnO (óxido de zinco); TiO₂ (dióxido de titânio); PVC (policloreto de vinila); PVP-Au (NPs de ouro revestidas com polivinilpirrolidona); Ag (prata).

3.2 Espécies estudadas

Entre os 10 trabalhos publicados, 9 avaliaram o SI do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, espécie que está distribuída por toda a costa do mediterrâneo e no nordeste do atlântico, desde a Escócia e Irlanda até o sul do Marrocos e Ilhas Canárias (TOMŠIĆ et al., 2010). Além disso, o *P. lividus* foi indicado para inclusão na lista de modelos animais alternativos apresentada pela Parceria Europeia para Abordagens Alternativas aos Testes em Animais (EPAA – do inglês *European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing*) (PINSINO; ALIJAGIC, 2019), por se tratar justamente de um organismo que apresenta uma estreita relação genética com humanos (HIBINO et al., 2006; SMITH et al., 2018; PINSINO, 2019).

Praticamente todos os trabalhos conduzidos com *P. lividus* foram realizados na Itália, país banhado pelo mar mediterrâneo, onde a espécie é muito comum. Também houve contribuição de mais um país, Canadá, que utilizou como modelo a espécie *Strongylocentrotus droebachiensis*, respectivamente. Os escassos trabalhos que utilizam bolachas-da-praia para investigar os efeitos de nanocontaminantes se concentram na área de desenvolvimento embrionário (KUKLA et al., 2022; MAZUR et al., 2020), ainda não havendo nenhum trabalho publicado que aborde o sistema imune bolachas-da-praia frente aos efeitos de NPs.

É evidente que a utilização dos ouriços-do-mar nos estudos de sistema imune é mais comum devido à praticidade principalmente por causa do seu tamanho e forma, que permitem um melhor acesso às estruturas internas do animal, até mesmo para a coleta do FC. No entanto, as bolachas-da-praia se destacam como modelos ideais para estudo devido a sua ampla distribuição, alta densidade populacional, hábitat em áreas costeiras e tamanho reduzido, o que as torna facilmente acessíveis e de fácil manutenção (FRANÇA, 2023). Plee e Pomory (2021) corroboram com essa ideia ao demonstrar que

as bolachas-da-praia podem reter partículas, como microplásticos, por pelo menos uma semana, sugerindo que esses animais podem atuar como bioindicadores da entrada de contaminantes na teia trófica. Além disso, França (2023) ressalta que, devido à proximidade evolutiva em nível celular, o sistema imunológico das bolachas-da-praia é muito semelhante ao dos ouriços-do-mar, o que aponta para seu potencial uso em pesquisas de monitoramento ambiental.

3.3 Outras metodologias utilizadas

Em todos os estudos, as coletas dos animais foram realizadas em áreas não poluídas ou protegidas, evidenciando uma preocupação com a qualidade ambiental e a saúde dos organismos utilizados. A aclimação dos animais em laboratório variou entre 5 a 14 dias, mas a maioria dos artigos optou pelo período de 1 semana. A aclimação é considerada essencial para reduzir o estresse nos ouriços-do-mar e garantir a validade dos resultados experimentais (PINSINO; ALIJAGIC, 2019). A aclimação ocorreu com condições controladas de salinidade, pH, e temperatura da água entre 15°C a 18°C, com um consenso em torno de 16°C (3 estudos) de ASW ou NSW com aeração constante (CATALANO *et al.*, 2020; PINSINO; ALIJAGIC, 2019). Quatro trabalhos utilizam ASW na aclimação dos animais, enquanto dois utilizam NSW. Além disso, a densidade de população (número de animais por volume de água) foi mantida constante, com uma média de 1 animal para cada 10 a 20 L de água, segundo os trabalhos. A troca e checagem de água é mencionada em algumas metodologias (MARQUES-SANTOS *et al.*, 2018), como essencial para manutenção da qualidade da água durante o período de aclimação.

Todos os estudos realizaram a mesma técnica para obtenção dos celomócitos, que consiste na inserção de uma seringa estéril de 1 mL na membrana peristomial, utilizando uma solução anticoagulante (PINSINO; ALIJAGIC, 2019). Evitar a coagulação do fluido é importante para a preservação da amostra e a realização de análises subsequentes (MATRANGA *et al.*, 2000, 2005). Matranga *et al.* (2005) também enfatizam que esse processo deve ser feito com muita cautela para manter as características dos celomócitos. Logo após esse processo, o FC passou pelo processo de centrifugação, relatado por todos os autores, para separação dos celomócitos do fluido.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada em 6 trabalhos com métodos variados, o que mostra a diversidade de abordagens utilizadas na pesquisa sobre os efeitos

de nanopartículas em celomócitos de ouriços-do-mar. Três estudos utilizaram o ensaio de exclusão de azul de tripano, um método clássico, onde células viáveis permanecem incolores enquanto as células mortas são coradas em azul (STROBER, 2015).

A estabilidade da membrana lisossomal foi investigada nos dois trabalhos com PS-NPs e por Pinsino *et al.* (2015), utilizando o ensaio de retenção do vermelho neutro (NRRT – do inglês *Neutral Red Retention Time assay*), que mede a capacidade das células de reter o corante vermelho neutro dentro de seus lisossomos (LOWE *et al.*, 1995), o indicando a integridade da membrana celular e a saúde da célula. O ensaio NRRT foi efetuado utilizando o corante NR como marcador da acidificação nos fagócitos (Pinsino *et al.*, 2015), mas também em lisossomos primários das células vibráteis (PINSINO; MATRANGA, 2015). Outros três estudos realizaram a avaliação da viabilidade celular utilizando o “RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay”, um método que permite a medição em tempo real da viabilidade celular com base na atividade metabólica mitocondrial (PINSINO; ALIJAGIC, 2019). A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio “CellTox™ Green Cytotoxicity”, que aparece nos mesmos 3 estudos.

A atividade fagocítica foi quantificada por meio de ensaios de ingestão de partículas, onde os celomócitos foram expostos a nanopartículas de poliestireno fluorescentes (MARQUES-SANTOS *et al.*, 2018), leveduras (MURANO *et al.*, 2021), NPs de óxidos metálicos (FALUGI *et al.*, 2012) e nanoesferas fluorescentes (ALIJAGIC *et al.*, 2019). No caso das partículas fluorescentes, foi descrito a microscopia de fluorescência como método para avaliar a fagocitose. Já Manzo *et al.* (2017) e Magesky *et al.* (2017) utilizaram microscopia eletrônica de varredura para visualizar a fagocitose de maneira mais detalhada, permitindo a observação da morfologia das células após a ingestão de nanopartículas. Alguns estudos complementaram a análise com a observação direta de celomócitos sob microscopia óptica ou confocal, para avaliar a internalização de partículas.

Após a coleta das células, as metodologias de isolamento de proteínas incluíram a lise celular em tampões apropriados, como tampões de lisis que contêm inibidores de proteases, garantindo a proteção das proteínas durante o processo de extração. A composição dos tampões variou entre os estudos, mas a maioria utilizou componentes como Tris, EDTA, β -mercaptoetanol e detergentes, como NP-40 ou Triton-X100, para promover a solubilização das proteínas.

A quantificação das proteínas foi realizada usando métodos como o ensaio de Bradford (3 estudos), que permite a determinação da concentração de proteínas na

amostra com base na absorção a 595 nm (KIELKOPF; BAUER; URBATSCH, 2020). O método que foi mais frequente nos estudos foi a eletroforese em gel (SDS-PAGE) (5 estudos), onde as proteínas foram separadas com base em seu peso molecular, e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose para análises posteriores, como Western blotting, nos mesmos 5 estudos.

A identificação específica de proteínas que medeiam a resposta inflamatória, como HSP70, GRP78, TRL4 foi feita utilizando anticorpos específicos que foram incubados com as membranas, seguidos de detecção com anticorpos secundários marcados (ALIJAGIC *et al.*, 2019). Além disso, alguns estudos utilizaram técnicas de espectrometria de massa para caracterizar as proteínas isoladas, permitindo uma identificação mais detalhada das proteínas presentes nas amostras.

A atividade enzimática foi avaliada em 6 artigos, com foco em enzimas relacionadas à função imune e ao metabolismo celular. As enzimas mais comumente analisadas incluem colinesterases, nesse caso, acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e proporcionilcolinesterase (PrChE) citadas por Falugi *et al.*, 2012. Alguns artigos avaliaram também a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que são cruciais na defesa contra o estresse oxidativo. A avaliação da atividade enzimática e do estresse oxidativo nos artigos estão interligadas, pois a atividade enzimática muitas vezes é utilizada como um indicador do estresse oxidativo (MATRANGA; BONAVENTURA; DI BELLA, 2002).

A produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica foi quantificada em alguns trabalhos avaliados. A peroxidação foi frequentemente medida por meio da formação de malondialdeído (MDA), que é um produto de degradação da lipoperoxidação. As metodologias variam, mas muitas utilizam uma combinação de medições de marcadores de dano oxidativo (como MDA) e da atividade de enzimas antioxidantes (como SOD e catalase). Essas abordagens fornecem uma visão abrangente do estado oxidativo das células e ajudam a entender os efeitos das nanopartículas sobre o sistema imune.

3.4 Efeitos observados

3.4.1 Efeitos das NPs de óxidos metálicos

Falugi *et al.* (2012) observaram que a internalização de nanopartículas de óxidos metálicos (CeO₂, FeO₄, SnO₂) pelos celomócitos de *P. lividus* ocorreu após 5 dias de exposição, revelando uma incapacidade do organismo de eliminar essas partículas, resultando em bioacumulação e efeitos tóxicos (ROCHA *et al.*, 2018). Essa internalização, como observado por Canesi *et al.* (2010) em hemócitos de mexilhões, levou às mudanças nas organelas celulares, como o sistema trans-Golgi e o retículo endoplasmático rugoso (RER). Além disso, houve uma inibição significativa da atividade de colinesterases (ChE) e uma redução dos níveis das proteínas HSC70 e GRP78, sugerindo uma possível supressão do sistema imune inato devido à alta concentração de NPs. Esse resultado está de acordo com Salminen *et al.* (2008), que indicaram que a supressão da sinalização imune pode ser uma resposta celular estratégica ao estresse, permitindo a sobrevivência frente a lesões.

Contudo, Falugi *et al.* (2012) revelaram que a exposição às NPs resulta em uma regulação negativa das proteínas de choque térmico em ouriços-do-mar, contradizendo estudos anteriores que indicavam uma regulação positiva em resposta a estressores ambientais como temperatura, pH e metais pesados. Este achado levanta a necessidade de estudos mais detalhados que explorem a imunossupressão induzida por NPs em equinodermos.

A ingestão de NPs por meio da dieta é um mecanismo ainda pouco investigado, mas estudos como de Gambardella *et al.* (2014) já evidenciaram que larvas de ouriços alimentadas com microalgas expostas a NPs de óxidos metálicos sofrem tanto em termos de sobrevivência quanto de alterações morfológicas. Segundo Falugi *et al.* (2012), as NPs poderiam atingir os celomócitos via intestino, onde seriam fagocitadas, ou serem absorvidas diretamente por células progenitoras do epitélio intestinal.

Manzo *et al.* (2017) demonstraram que NPs de ZnO, especialmente as de menor tamanho (14 nm), causaram maior toxicidade em ouriços-do-mar alimentados com dietas contaminadas, sendo observada uma redução da viabilidade celular e danos ao DNA após uma semana de exposição. Embora não tenham encontrado diferenças estatísticas entre as concentrações utilizadas, o estudo reforça a hipótese de que NPs menores são mais tóxicas devido à maior área de superfície, corroborando o observado por Kim *et al.* (2012) Katsumiti *et al.*, (2015) com TiO₂NPs.

Pinsino *et al.* (2015) foram pioneiros na investigação dos efeitos das nanopartículas de TiO₂ nas células imunes de ouriços-do-mar, revelando que essas partículas aumentam significativamente a atividade fagocítica dos celomócitos de

Paracentrotus lividus. Ao comparar com células do grupo controle, a capacidade de captura e englobamento de partículas foi notavelmente elevada, evidenciando a ativação dos receptores Toll-like (TLRs), que mostraram maior expressão em resposta à exposição às NPs. Este achado se alinha a estudos que indicam que o TLR4 medeia a absorção de nanopartículas, incluindo as de TiO₂, em mamíferos (CUI et al., 2011).

A ativação do TLR4 é crucial para o reconhecimento e resposta às partículas estranhas, e a via de sinalização p38 MAPK é fundamental na resposta imune induzida pelas NPs (PINSINO et al., 2015; NEWTON; DIXIT, 2012). A inibição dessa via resulta em redução da atividade fagocítica, sublinhando seu papel mediador. Geralmente, a ativação do TLR4 inicia uma cascata de sinalização que ativa MAPK (p38 MAPK, ERK), resultando na elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12 e TNF- α (NEWTON; DIXIT, 2012).

No entanto, Pinsino *et al.* (2015) observaram resultados inesperados, com células expostas a TiO₂NP apresentando inibição nos níveis de fosforilação de p38 MAPK e regulação negativa do gene PI-NF- κ B, além de redução da expressão intracelular de IL-6. Já ácido L-pirolglutâmico e o ácido L-lático, que é produzido em grandes quantidades por células imunes durante a ativação inflamatória, diminuíram significativamente. Essa redução indica um sinal de feedback negativo para atenuar respostas inflamatórias (RATTER *et al.*, 2018). Os níveis significativamente reduzidos de ácido pirolglutâmico observados durante a exposição ao T-AVO podem indicar um aumento na atividade metabólica antioxidante. Embora sutis, também houve um aumento nos níveis de L-serina e ácido pirúvico em comparação com as células não expostas.

Nos estudos anteriores do grupo de pesquisa, realizados por Alijagic *et al.* (2020, 2021), demonstraram que o sistema imune inato do ouriço-do-mar é capaz de controlar a sinalização inflamatória, estimular a atividade metabólica antioxidante e adquirir tolerância imunológica. Os resultados deste estudo mostram que os filtros UV comerciais à base de nanopartículas (NPs) de TiO₂ não apresentam impactos significativos na imunidade do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) em concentrações que são esperadas em áreas costeiras durante o verão.

Os autores concluíram que as concentrações das NPs T-AVO consistentes com o ciclo de vida dos cosméticos não mostraram toxicidade às células imunes. No entanto, a análise do perfil metabólico indicou que as NPs T-AVO possuem maior compatibilidade imunológica em comparação com as NPs P25 após 72 horas de exposição, reforçando a

segurança dos filtros UV comerciais à base de TiO₂ para sistema imune do ouriço-do-mar.

Tabela 3.

A intensidade da atividade fagocítica aumentou em função da concentração de TiO₂NP, sugerindo que doses mais elevadas podem intensificar a resposta imune (PINSINO et al., 2015). Observações de fagócitos indicaram uma rede crescente de vesículas, confirmando atividade fagocítica em andamento. Contudo, as NPs não afetaram a polarização das membranas do Trans-Golgi/RER, contrastando com achados de Falugi *et al.* (2012) que relataram impactos semelhantes em NPs de óxidos metálicos. Mudanças morfológicas nas células imunes foram notadas, possivelmente sinalizando ativação ou estresse celular.

Pinsino e colaboradores (2015) concluem que a eliminação das NPs parece estar completa em um dia, levando à hipótese de que as partículas podem ser fagocitadas eficientemente e que as células hospedeiras se deslocam do fluido celômico para outras partes do corpo, acumulando-se em órgãos ou tecidos ou sendo eliminadas pelo sistema vascular. No entanto, são necessários mais estudos para validar essas hipóteses.

Alijajic *et al.* (2019) investigaram a interação entre proteínas extracelulares de *Paracentrotus lividus* e TiO₂NPs, explorando a adsorção de proteínas nas superfícies das NPs para determinar quais proteínas se ligam a elas e sob quais condições. Baseando-se em Monopoli et al. (2012) que relataram que as partículas se envolvem rapidamente em um fluido biológico complexo, formando uma coroa proteica, o estudo observou que o aumento das concentrações resultou em maior quantidade de proteínas na coroa, mas algumas mostraram redução nos níveis em comparação com o grupo controle.

Os resultados contrastam com os achados de Falugi *et al.* (2012) em óxidos metálicos, sugerindo que o TiO₂ pode ter afinidade seletiva por algumas proteínas e não por outras. A interação entre proteínas e NPs pode variar desde opsonização por proteínas imunes até captação por células fagocíticas, sendo um processo essencial para determinar a resposta imunológica subsequente, que pode ativar ou suprimir a resposta (LEE et al., 2014).

A incubação de 1 µg/mL de TiO₂NP por 3 e 24 horas com proteínas secretas induzidas e não induzidas *in vitro* não demonstrou efeitos prejudiciais nas funções fisiológicas das células imunes. A viabilidade e citotoxicidade das células foram consistentes com o controle ao longo de 3 dias. Entretanto, a concentração mais alta de

TiO₂NP (100 µg/mL) levou a uma redução acentuada na viabilidade e aumento significativo na toxicidade (ALIJAGIC *et al.*, 2019).

Diferente dos resultados de Pinsino *et al.* (2015), aqui não foram detectadas alterações no Hsp70 e p38 MAPK, que indicariam estresse celular. A ausência de liberação de Hsp70 e ativação da p38 MAPK sugere que as células imunes mantiveram um estado saudável, sem estresse oxidativo ou ativação de caspases.

Alijagic *et al.* (2019) concluíram que os complexos TiO₂NP-proteínas facilitam a internalização das partículas por meio de receptores e do citoesqueleto, permitindo que as células absorvam as partículas rapidamente, sem provocar efeitos imunológicos adversos, reconhecendo esses complexos como "próprios".

Alijagic *et al.* (2020) avaliaram os efeitos temporários das TiO₂NPs no sistema imunológico do ouriço-do-mar, focando na supressão da transcrição de genes relacionados à inflamação e na atividade metabólica antioxidante. A metodologia foi similar à de Pinsino e Alijagic (2019). O aumento da atividade fagocítica foi confirmado pelo encapsulamento e internalização de nanoesferas fluorescentes após 1 hora de incubação.

A análise de microscopia eletrônica de transmissão revelou a localização intracelular das NPs em vesículas endocíticas/citoplasmáticas, formando uma rede com diferentes graus de maturação. A exposição às NPs resultou em redução temporária na expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios, com expressões diferenciais significativas em células imunes em 24 horas comparadas a células não expostas de dois doadores distintos (ALIJAGIC *et al.*, 2020).

Os genes que responderam à exposição a TiO₂ estavam relacionados à sinalização de receptores de superfície celular e regulação da resposta imune (FGFR2, GSK3B, NF-κB, JUN), bem como na via de sinalização BMP (NOTCH1) e na defesa apoptótica (HSP90B1, caspase 8, NF-κB, JUN, MAPK14, FAS, GSK3B). O efeito supressor foi observado em genes que codificam proteínas mediadoras da sinalização apoptótica e da resposta inflamatória, com redução na expressão em células expostas ao TiO₂ em comparação com o controle. Os dados indicam regulação negativa de fatores como VEGFR e FGFR, associados à supressão da função celular imune e ao crescimento tumoral (HOLMSTROM *et al.*, 2019).

No entanto, alguns transcritos, como GP96 (HSP90B1) e Galectina 8, mostraram efeito estimulante. Essas moléculas são cruciais para a regulação da inflamação, estresse e imunidade durante a exposição a TiO₂NP, mantendo um equilíbrio entre sinais

homeostáticos e inflamatórios para funções metabólicas ideais das células imunes (ALEMAN-MUENCH; SOLDEVILA, 2012). A GP96 desempenha papel importante na imunidade por sua capacidade de se ligar a peptídeos, com interações potenciais com receptores Toll-like (VABULAS *et al.*, 2002), enquanto a HSP70II e IV (HSPA2/HSP72) apresentaram expressão diminuída.

Observou-se também a diminuição de proteínas de adesão celular como as nectinas (Pl-Nectina) após 24 horas de exposição, sugerindo um mecanismo equivalente à inibição do crescimento tumoral (MANDAI *et al.*, 2015). Um leve aumento nos níveis de IL-6, citocina da resposta inflamatória, foi registrado. Esses resultados reforçam a ideia de que as células imunológicas do ouriço-do-mar ativam mecanismos para controlar a inflamação e promover a sobrevivência celular durante a exposição a TiO₂NPs.

Catalano *et al.* (2020) baseiam seus estudos na premissa de que componentes ativos de protetores solares devem permanecer na camada superficial da pele, mas ao entrar na circulação, podem provocar respostas imunes. Nesse sentido, avaliaram a viabilidade e citotoxicidade dos celomócitos expostos às NPs T-AVO (TiO₂) durante 48h, e caracterizaram o seu perfil metabólico após 72h de exposição.

Não foram encontrados efeitos tóxicos significativos em concentrações de 0,1 a 10 mg/L, sendo observada uma diminuição significativa da viabilidade e uma elevada toxicidade celular nas duas maiores concentrações (100 e 500 mg/L), como já era esperado pela rápida agregação das NPs, que pode levar à desestabilização e sedimentação das partículas. Nas menores concentrações, foi observado, baseado no potencial redutor da célula, um aumento não significativo na viabilidade/atividade metabólica em comparação com os grupos controles. De acordo com Pleuvry (2008) essa reação é resultado de um efeito de histerese, que ocorre durante a administração de medicamentos. Nesse processo, o efeito de um fármaco diminui apesar de sua presença contínua no organismo, atuando como um mecanismo de tolerância.

Os autores realizaram também a caracterização do perfil metabólico das células imunes expostas à T-AVO, a P25 e células não expostas em 72h. As NPs de TiO₂ P25 foram utilizadas aqui como um controle negativo para o T-AVO funcionalizado. Sendo assim, identificaram alterações no nível de 8 metabólitos entre os grupos: incluindo aminoácidos proteinogênicos (serina, glutamina), derivados de aminoácidos (ácido L-pirolutâmico), ácidos orgânicos (ácido L-lático, ácido glutárico, ácido pirúvico), metabólitos de sulfato (sulfato) e acetamidas (acetamidovalerato).

Glutamina e acetamidovalerato aumentaram significativamente em comparação com os controles não expostos, tendo em vista que a primeira é necessária para manter a função celular normalizada, principalmente em eventos inflamatórios (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Já ácido L-pirolutâmico e o ácido L-lático, que é produzido em grandes quantidades por células imunes durante a ativação inflamatória, diminuíram significativamente. Essa redução indica um sinal de feedback negativo par atenuar respostas inflamatórias (RATTER *et al.*, 2018). Os níveis significativamente reduzidos de ácido pirolutâmico observados durante a exposição ao T-AVO podem indicar um aumento na atividade metabólica antioxidante. Embora sutis, também houve um aumento nos níveis de L-serina e ácido pirúvico em comparação com as células não expostas.

Nos estudos anteriores do grupo de pesquisa, realizados por Alijagic *et al.* (2020, 2021), demonstraram que o sistema imune inato do ouriço-do-mar é capaz de controlar a sinalização inflamatória, estimular a atividade metabólica antioxidante e adquirir tolerância imunológica. Os resultados deste estudo mostram que os filtros UV comerciais à base de nanopartículas (NPs) de TiO₂ não apresentam impactos significativos na imunidade do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) em concentrações que são esperadas em áreas costeiras durante o verão.

Os autores concluíram que as concentrações das NPs T-AVO consistentes com o ciclo de vida dos cosméticos não mostraram toxicidade às células imunes. No entanto, a análise do perfil metabólico indicou que as NPs T-AVO possuem maior compatibilidade imunológica em comparação com as NPs P25 após 72 horas de exposição, reforçando a segurança dos filtros UV comerciais à base de TiO₂ para sistema imune do ouriço-do-mar.

Tabela 3. Efeitos de diferentes nanopartículas no SI de equinoides.

Referência	Espécie	Nanopartícula e tamanho	Resposta observada/efeito/moléculas
Falugi <i>et al.</i> , 2012	<i>P. lividus</i>	61 nm (SnO ₂), 50-105 nm (CeO ₂), 20-30 nm (Fe ₃ O ₄)	Passagem das NPs do intestino para o FC; Diminuição da atividade da ChE e HSP70
Pinsino <i>et al.</i> , 2015	<i>P. lividus</i>	TiO ₂ (10-65 nm)	Aumento na atividade fagocítica; Ativação de cascatas de sinalização: TRLs, HSP70; IL-6
Magesky <i>et al.</i> , 2017	<i>S. droebachiensis</i>	AgNP (8-15 nm)	Estresse oxidativo; Aumento na expressão de HSP70; Passagem do intestino para o FC
Manzo <i>et al.</i> , 2017	<i>P. lividus</i>	ZnO NPs (100 nm e 14 nm)	Citotoxicidade em celomócitos e danos no DNA
Marques-Santos <i>et al.</i> , 2018	<i>P. lividus</i>	PS-NH ₂ NPs (50 nm)	Formação da ecocorona
Alijagic <i>et al.</i> , 2019	<i>P. lividus</i>	TiO ₂ NP (10-65 nm)	Formação da ecocorona
Alijagic <i>et al.</i> , 2020	<i>P. lividus</i>	TiO ₂ NPs (21 nm)	Aderência e fagocitose
Catalano <i>et al.</i> , 2020	<i>P. lividus</i>	TiO ₂ NPs (21 nm)	Síntese de mediadores inflamatórios; Fagocitose
Alijagic <i>et al.</i> , 2021	<i>P. lividus</i>	PVP–AuNPs	Metabolismo celular; Expressão de CD45 e CD14
Murano <i>et al.</i> , 2021	<i>P. lividus</i>	PS-COOH e PS-NH ₂ NPs (50-60 nm)	Fagocitose; Estabilidade da membrana lisossomal

*NPs (nanopartículas); AgNP (nanopartículas de prata); PVP-AuNPs (nanopartículas de ouro revestidas com polivinilpirrolidona); PS-NH₂ (nanopartículas de poliestireno funcionalizadas com grupamentos amino); PS-COOH (nanopartículas de poliestireno funcionalizadas com grupamentos carboxila); SnO₂ (dióxido de estanho); CeO₂ (dióxido de cério); Fe₃O₄ (óxido de ferro); TiO₂ (dióxido de titânio); ZnO (óxido de zinco); ChE (colinesterase); HSP70 (proteína de choque térmico 70); TRLs (receptores do tipo Toll); IL-6 (interleucina-6); SI (sistema imunológico); CD (Cluster of Differentiation - co-receptor envolvido no reconhecimento de patógenos); CD45 (Cluster of Differentiation 45); CD14 (Cluster of Differentiation 14).

3.4.2 Efeitos das AuNPs

O estudo de Alijagic *et al.* (2021) teve como objetivo investigar a interação entre nanopartículas de ouro e as células imunes do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Os resultados indicaram um aumento no tamanho dos fagócitos, sugerindo a absorção das partículas. A combinação de partículas e bactérias apresentou características associadas a ambos os tipos de deslocamento, revelando uma dinâmica complexa nas interações celulares. Notou-se um menor número de células CD45 positivas após a exposição ao *Vibrio* em animais quiescentes, enquanto a combinação de partículas e *Vibrio* levou a um aumento das células CD45 positivas (ALIJAGIC *et al.*, 2021). Em mamíferos, o CD45 desempenha um papel regulador na secreção de citocinas mediada pelo receptor TLR nas células dendríticas, influenciando a maturação celular, embora não seja essencial para seu desenvolvimento. A ligação do CD45 ao TLR4 inibe negativamente as vias de sinalização do TLR4, resultando em uma redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (CROSS *et al.*, 2008).

Os autores especularam que o aumento de células CD45-positivas estimuladas pelas PVP-AuNPs pode estar relacionado a um maior número de células diferenciadas. O CD14 apresentou uma tendência semelhante à do CD45, com um aumento nas células positivas em alguns animais após a exposição às PVP-AuNPs.

A exposição ao *Vibrio* ativou a via TLR4/NF-κB, evidenciada pelo aumento dos níveis de IL-6 e outras proteínas associadas à resposta inflamatória. No entanto, os níveis de Hsp70 e da superóxido dismutase de manganês (MnSOD) não apresentaram alterações

significativas após a exposição ao *Vibrio* ou às PVP–AuNPs. Em contraste com estudos anteriores, não foram observadas diferenças significativas na fosforilação da p42/44 MAP Kinase (pERK). Contudo, a exposição ao *Vibrio* resultou em um aumento estatisticamente significativo nos níveis da proteína de adesão celular PI-nectina, conhecida por mediar o reconhecimento imunológico de patógenos em humanos (GAO, 2013). Esse achado sugere a ocorrência de agregação celular e formação de coágulos.

As PVP-AuNPs não demonstraram efeitos adversos no sistema imunológico dos ouriços-do-mar, apresentando, na verdade, um potencial imunomodulador contra infecções por *Vibrio*, ao estimular um subconjunto de células envolvidas na maturação e ativação de macrófagos via TLR4/NF- κ B. No entanto, observou-se que a exposição a altas concentrações de *Vibrio* induz uma resposta inflamatória patológica, sem resolução completa. Assim, mais estudos com ajustes experimentais são necessários para confirmar o efeito das PVP-AuNPs no sistema imunológico dos ouriços.

3.4.3 Efeitos dos Nanoplásticos

Marques-Santos *et al.* (2018) investigaram a interação das nanopartículas de poliestireno amino (PS-NH₂) com o fluido celômico (FC) do ouriço-do-mar, revelando que, após a incubação, as partículas formaram uma camada biomolecular translúcida e compacta, composta por proteínas extracelulares que configuram a chamada corona. Este fenômeno é semelhante ao que Walczyk *et al.* (2010) observaram em fluidos biológicos de mamíferos, indicando que a coroa proteica (TPP) ao redor do PS-NH₂ desempenha um papel crucial nas interações biológicas das nanopartículas com as células imunes do ouriço-do-mar.

No estudo, foi identificada uma proteína de 180 kDa como a subunidade de Toposoma, uma glicoproteína que se liga ao cálcio e está associada à adesão celular e ao estresse celular (PINSINO; THORNDYKE; MATRANGA, 2007). Notou-se uma redução significativa na viabilidade celular após 4 horas de exposição aos PS-NH₂ nas concentrações de 10 e 25 mg/mL, porém sem a presença de EDTA. A internalização das partículas foi observada apenas em fagócitos, que desempenham um papel fundamental na resposta imune inata dos ouriços-do-mar, enquanto a presença de EDTA diminuiu a toxicidade das nanopartículas, sugerindo que o cálcio é essencial para a adesão e resposta contra toxicidade. Os autores relataram que o EDTA desestabiliza o TPP, evidenciando que a interação entre PS-NH₂ e TPP é mediada por cálcio, especialmente em fagócitos.

A exposição aos PS-NH₂ resultou em uma diminuição dose-dependente na acumulação de calceína, indicando um aumento na atividade de efluxo dos transportadores ABC. Entretanto, a fenotipagem MXR não apresentou alterações significativas nas diferentes concentrações de PS-NH₂, possivelmente devido a um aumento compensatório na expressão dos genes dos transportadores ABC, uma resposta que já foi observada em estudos anteriores por Della Torre *et al.* (2014). Assim, as descobertas ressaltam a necessidade de mais pesquisas sobre os impactos dos nanoplásticos em organismos marinhos, com foco nas interações entre nanopartículas e a proteína corona, assim como nas respostas imunológicas.

Por sua vez, Murano *et al.* (2021) relataram que a exposição a PS-NH₂ causou uma redução significativa na viabilidade celular, enquanto o PS-COOH não apresentou efeitos relevantes na viabilidade, exceto em concentrações mais elevadas. Embora ambas as partículas causassem desestabilização das membranas lisossômicas em altas concentrações, os PS-NH₂ demonstraram um impacto mais acentuado na atividade fagocítica e na integridade celular. Em contraste, os PS-COOH foram rapidamente internalizados pelos fagócitos, mostrando alta intensidade de fluorescência, o que indica uma boa absorção e compartimentalização.

Adicionalmente, os nanoplásticos de poliestireno (PS) em um meio alcalino e com alta força iônica, como a água do mar, tendem a aglomerar, sendo esse fenômeno mais pronunciado para as nanopartículas aniônicas (PS-COOH) do que para as catiônicas (PS-NH₂) (CORSI; BERGAMI; GRASSI, 2020; PRAETORIUS *et al.*, 2020). Segundo os autores, este comportamento pode ser atribuído à osmolaridade e à composição iônica do fluido celômico (CF) dos ouriços-do-mar, que se ajusta à água do mar ao seu redor. As proteínas imunes presentes no CF se ligam à superfície das nanopartículas, alterando seu comportamento. Assim, a composição do CF pode influenciar o tamanho e a formação dos aglomerados de PS-NPs, impactando a resposta biológica aos nanoplásticos em condições naturais.

Ambos os estudos concordam que os PS-COOH foram internalizados por fagócitos dos ouriços-do-mar, assim como os PS-NH₂, corroborando os resultados de Marques-Santos *et al.* (2018). Os fagócitos são cruciais na resposta imune inata (MATRANGA *et al.*, 2005), e a internalização das nanopartículas pode alterar a morfologia celular, a estabilidade da membrana lisossômica e a atividade fagocítica. Embora ambos os tipos de nanopartículas reduzissem a atividade fagocítica, o PS-NH₂ mostrou uma toxicidade maior, causando uma diminuição significativa na atividade dos

fagócitos e na estabilidade das membranas lisossômicas, enquanto o PS-COOH causou menos danos.

Vale destacar que todos esses estudos utilizaram concentrações experimentais de nanopartículas mais elevadas do que as encontradas na natureza, uma vez que alta fragmentação desses materiais torna as concentrações em algumas áreas preocupantes (ROGERS et al., 2020; LAMICHHANE *et al.*, 2023). Murano *et al.* (2021) ressaltam que as PS-NPs carregadas negativamente, como PS-COOH, são semelhantes a nanoplasticos naturais e podem representar um risco para as comunidades marinhas. Assim, é essencial que sejam conduzidos mais estudos para compreender melhor os efeitos desses contaminantes na natureza em concentrações realistas.

CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos de diferentes tipos de nanocontaminantes no sistema imunológico de equinoides utilizando estudos disponíveis na literatura até o presente momento. Os resultados revelam impactos preocupantes nas funções essenciais da resposta imunológica, como a fagocitose, atividade enzimática e também na viabilidade celular. Esses efeitos podem comprometer a função imunológica dos animais, das populações de equinoides e, conseqüentemente, a saúde dos ecossistemas marinhos.

No entanto, ainda existem muitas lacunas na literatura, especialmente em relação às concentrações ambientalmente realistas e aos impactos de longo prazo nos ambientes marinhos. A maioria dos estudos abordados foca em exposições agudas, deixando em aberto a compreensão dos efeitos cumulativos e crônicos das nanopartículas no sistema imune. Além disso, vale destacar que os efeitos da interação entre nanocontaminantes e outros poluentes, como metais pesados e microplásticos no sistema imune de equinoides, permanece pouco explorados ou até inexistentes na literatura.

Os futuros estudos devem abordar os desafios emergentes no campo de estudo, utilizando diversas espécies de equinoides e investigando os efeitos combinados de múltiplos contaminantes, o que reflete a realidade. A inclusão de espécies como as bolachas-da-praia e a exploração de uma abrangência geográfica mais ampla são essenciais para avançar no conhecimento sobre as respostas imunológicas dos organismos da classe Echinoidea frente às contaminações ambientais. Essa investigação não vai apenas contribuir com a avaliação de riscos, mas também vai impulsionar

significativamente o desenvolvimento de estratégias eficazes de mitigação de riscos e a preservação dos ecossistemas marinhos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT CHALEW, T. E.; GALLOWAY, J. F.; GRACZYK, T. K. Pilot study on effects of nanoparticle exposure on *Crassostrea virginica* hemocyte phagocytosis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 10, p. 2251–2253, 2012.

ALCALA-ALCALA, S.; QUINTANAR-GUERRERO, D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. **Mundo Nano**, v. 7, n. 12, p. 32–48, 2014.

ALEMAN-MUENCH, G. R.; SOLDEVILA, G. **When versatility matters: Activins/inhibins as key regulators of immunity.** *Immunology and Cell Biology*, 2012.

ALEXANDER, D. E.; GHIOLD, J. The functional significance of the lunules in the sand dollar, *Mellita quinquiesperforata*. **Biological Bulletin**, v. 159, p. 561–570, 1980.

ALIJAGIC, A. et al. Sea Urchin Extracellular Proteins Design a Complex Protein Corona on Titanium Dioxide Nanoparticle Surface Influencing Immune Cell Behavior. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

ALIJAGIC, A. et al. Titanium dioxide nanoparticles temporarily influence the sea urchin immunological state suppressing inflammatory-related gene transcription and boosting antioxidant metabolic activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, 2020.

ALIJAGIC, A. et al. Immunomodulatory function of polyvinylpyrrolidone (Pvp)-functionalized gold nanoparticles in vibrio-stimulated sea urchin immune cells. **Nanomaterials**, v. 11, n. 10 2021.

ALIJAGIC, A.; PINSINO, A. Probing safety of nanoparticles by outlining sea urchin sensing and signaling cascades. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 416–421, 2017.

ALVES, M. B.; EMERENCIANO, A. A. K.; BORDON, I. C. ET AL. Biomonitoring evaluation of some toxic and trace elements in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) in a marine environment: northern coast of São Paulo (Brazil). **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 316, p. 781–790, 2018.

AMEMIYA, C. T.; MIYAKE, T.; RAST, J. P. Quick guide Echinoderms. **Current Biology**, v. 15, n. 23, p. 1–3, 2005.

ANDRADY, A. L. The plastic in microplastics: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 1, p. 12–22, 2017.

PINSINO, A.; THORNDYKE, M. C.; MATRANGA, V. Coelomocytes and post-

traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 4, p. 331–341, 2007.

ARIZZA, V. et al. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 2, p. 389–394, 2007.

BAKER, A. N.; ROWE, F. W. E.; CLARK, H. E. S. A new class of Echinodermata from New Zealand. **Nature**, v. 321, p. 862–864, 1986.

BARBERO, F. et al. Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System. **Seminars in Immunology**, v. 34, p. 52–60, 2017.

BECK, G.; HABICHT, G. S. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 7429–7433, 1986.

BERGAMI, E. et al. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 123, p. 18–25, 2016.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BORASCHI, D. et al. Interaction between nanomaterials and the innate immune system across evolution. **Biological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 747–774, 2023.

BRACHO VILLAVICENCIO, C.; GÓMEZ MADURO, M. C.; HERNÁNDEZ-ÁVILA, I. Impacts of fishing on the Caribbean white sea urchin, *Lytechinus variegatus*, in Margarita Island, Venezuela. **Marine Environmental Research**, v. 168, p. 105310, 2021.

BRANCO, P. C.; FIGUEIREDO, D. A. L.; SILVA, J. R. M. C. New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress. **Biology**, v. 2014b. 18, n. 2, p. 1, 2014.

BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Filo Echinodermata**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2018.

BUCKLEY, K. M. et al. Analysis of immune response in the sea urchin larva. **Methods in Cell Biology**, v. 150, p. 333–355, 2019.

BUCKLEY, K. M.; RAST, J. P. Immune activity at the gut epithelium in the larval sea urchin. **Cell and tissue research**, v. 377, n. 3, p. 469–474, 2019.

BURKE, R. D. The causes of things. Em: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2019. v. 151p. 49–54.

CAMMARATA, M.; PAGLIARA, P. Elie Metchnikoff and the multidisciplinary link novelty among Zoology, Embryology and Innate Immunity. **ISJ- Invertebrate Survival**

Journal, v. 15, p. 234–239, 2018.

CANESI, L. et al. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 168–177, 2010.

CANESI, L. et al. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. **Marine Environmental Research**, v. 111, p. 34–40, 2015.

CANESI, L.; CORSI, I. Effects of nanomaterials on marine invertebrates. **Science of The Total Environment**, v. 565, p. 933–940, 2016.

CANESI, L.; PROCHÁZKOVÁ, P. The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles. **Nanoparticles and the Immune System: Safety and Effects**, p. 91–112, 2013.

CARNOVALE, C. ET AL. Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake: Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, p. 242–256, 2019.

CASADO, M. P.; MACKEN, A.; BYRNE, H. J. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. **Environment international**, v. 51, p. 97–105, 2013.

CASALS, E. et al. Time evolution of the nanoparticle protein corona. **ACS Nano**, v. 4, n. 7, p. 3623–3632, 2010.

CATALANO, R. et al. Safety evaluation of TiO₂ nanoparticle-based sunscreen UV filters on the development and the immunological state of the sea urchin *paracentrotus lividus*. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 2020.

CHAN, K. Y. K. ; TONG, C. S. D. Temporal variability modulates pH impact on larval sea urchin development: Themed Issue Article: Biomechanics and Climate Change. **Conservation Physiology**, v. 8, n. 1, 2020.

CHEN, Q. et al. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 1022–1031, 2017.

CHIA, F.-S.; XING, J. Echinoderm Coelomocytes. **Zoological Studies**, v. 35, n. 4, p. 231–254, 1996.

CHIARELLI, R.; MARTINO, C.; ROCCHERI, M. C. Cadmium stress effects indicating marine pollution in different species of sea urchin employed as environmental bioindicators. **Cell stress & chaperones**, v. 24, n. 4, p. 675–687, 2019.

CHRISTIAN, P. et al. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 326–343, 2008.

CLOW, L. A. et al. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 12, p. 2147–2155, 2004.

CLOW, L. A.; TERWILLIGER, D. P.; SMITH, L. C. The ancestral complement system in sea urchins *Immunological Reviews*. **Immunological Reviews**, v. 180, p. 16–34, 2001.

COFFARO, K. A. **Transplantation immunity in the sea urchin**. Tese (Doutorado em Biologia)—Santa Cruz, CA: University of California, 1979.

COFFARO, K. A.; HINEGARDNER, R. T. Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. **Science**, v. 197, n. 4311, p. 1389–1390, 1977.

CONTINS, M. et al. Assessing the vulnerability of endangered and endemic brooding sea urchin *Cassidulus mitis* in response to climate change: Impacts on larvae and settlers in the southwestern Atlantic. **Marine Environmental Research**, v. 192, p. 106186, 2023.

CORSI, I. et al. Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment. **ACS Nano**, v. 8, n. 10, p. 9694–9709, 2014.

CORSI, I.; BERGAMI, E.; GRASSI, G. Behaviour and bio-interactions of anthropogenic particles in marine environment for a more realistic ecological risk assessment. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 60, 2020.

CROSS, J. L. et al. CD45 Regulates TLR-Induced Proinflammatory Cytokine and IFN- β Secretion in Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 8020–8029, 2008.

CUI, Y. et al. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 96 A, n. 1, p. 221–229, 2011.

DE OLIVEIRA, D. C. et al. Glutamine metabolism and its effects on immune response: molecular mechanism and gene expression. **Nutrire**, v. 41, n. 14, 2016.

DELLA TORRE, C. ET AL. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 20, p. 12302–12311, 2014.

DEVECI, R.; ŞENER, E.; IZZETOĞLU, S. Morphological and ultrastructural characterization of sea urchin immune cells. **Journal of Morphology**, v. 276, n. 5, p. 583–588, 2015.

DURHAM, J. M.; ET AL. Echinoids. Em: **In: Treatise on Invertebrate Paleontology**. Lawrence, Kansas: MOORE, R.C. (org.), v. 1 e 2, 1966.

EBERT, T. A. Negative growth and longevity in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). **Science**, v. 157, n. 3788, p. 557–558, 1967.

EDDS, K. T. Cell biology of echinoid coelomocytes. **Journal of Invertebrate**

Pathology, v. 61, n. 2, p. 173–178, 1993.

ELLERS, O.; TELFORD, M. Marine Biological Laboratory Collection of Food by Oral Surface Podia in the Sand Dollar, *Echinarachnius parma* (Lamarck). **Source: Biological Bulletin**, v. 166, n. 3, p. 574–582, 1984.

ERWIN, D. H. et al. The Cambrian Conundrum: Early Divergence and Later Ecological Success in the Early History of Animals. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1091–1097, 2011.

FERNÁNDEZ-BOO, S. et al. Annual assessment of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) humoral innate immune status: Tales from the north Portuguese coast. **Marine Environmental Research**, v. 141, p. 128–137, 2018.

FERNÁNDEZ-BOO, S. et al. Unravelling the main immune repertoire of *Paracentrotus lividus* following *Vibrio anguillarum* bath challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 147, p. 109431, 2024.

FERREIRA, I. et al. Nanoplastics and marine organisms: What has been studied? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 1–7, 2019.

FLEISCHER, C. C.; PAYNE, C. K. Nanoparticle-cell interactions: Molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 8, p. 2651–2659, 2014.

FRANÇA, A. D. Células do Sistema Imune da Bolacha-da-Praia *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778): Aspectos Morfológicos e Sazonais. **Dissertação (Mestrado em zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa**, 2023.

FRANCO, P.; DE MARCO, I. The Use of Poly (N-vinyl pyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review. **Polymers**, v. 12, n. 5, p. 1114, 2020.

GAMBARDELLA, C. ET AL. Toxicity and transfer of metal oxide nanoparticles from microalgae to sea urchin larvae. **Chemistry and Ecology**, v. 30, p. 308–316, 2014.

GAMBARDELLA, C. et al. Review: Morphofunctional and biochemical markers of stress in sea urchin life stages exposed to engineered nanoparticles. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1552–1562, 2016.

GAMBARDELLA, C. et al. Early-stage anomalies in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Overview and future perspectives. **Environmental Pollution**, v. 287, p. 117608, 2021.

GANGADOO, S. et al. Nano-plastics and their analytical characterisation and fate in the marine environment: From source to sea. **Science of The Total Environment**, v. 732, p. 138792, 2020.

GAO, G. Nectin and nectin-like molecules: immune regulator, adhesion molecule and virus receptors (P1001). **Journal of Immunology**, v. 190, p. 113, 2013.

GATTI, A. M. et al. Heavy metals nanoparticles in fetal kidney and liver tissues.

Frontiers in Bioscience, v. 3, n. 1, p. 221–226, 2011.

GLIŃSKI, Z.; JAROSZ, J. Phenomena imunitários em equinodermos. **Arquivos de Imunologia e Terapia Experimental (Varsóvia)**, v. 48, n. 3, p. 189–193, 2000.

GOLDSTEIN, I.; HUGHES, R.; MONSIGNY, M. ET AL. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOMES, T. et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 21, p. 9356–9362, 2011.

GOMES, T. et al. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 118–119, p. 72–79, 2012.

GONÇALVES, J. M.; BEBIANNO, M. J. Nanoplastics impact on marine biota: A review. **Environmental Pollution**, v. 273, p. 116426, 2021.

GONDIM, A. I. et al. Echinodermata da Praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, 2008.

GONDIM, A. I. et al. Current knowledge of echinoderms (Echinodermata) from the coast of Paraíba, northeastern Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidade**, v. 93, 2022.

GORDON, S. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927–930, 2002.

GORDON, S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 3, p. 223–227, 2016.

GUILLOU, M.; QUINIOU, F.; HUART, B. et al. Comparison of Embryonic Development and Metal Contamination in Several Populations of the Sea Urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck) Exposed to Anthropogenic Pollution. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p. 337–344, 2000.

HAYASHI, Y. et al. Species differences take shape at nanoparticles: Protein corona made of the native repertoire assists cellular interaction. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 24, p. 14367–14375, 2013.

HENDLER, G. et al. Sea stars, sea urchins and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean. **Smithsonian Institution Press**, p. 390, 1995.

HIBINO, T. et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. **Developmental Biology**, v. 300, n. 1, p. 349–365, 2006.

HILLIER, B. J.; VACQUIER, V. D. Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes. **The Journal of cell biology**, v. 160, n. 4, p. 597–604, 2003.

HILLIER, B. J.; MOY, G. W.; VACQUIER, V. D. Diversity of olfactomedin proteins in the sea urchin. **Genomics**, v. 89, n. 6, p. 721–730, 2007.

HO, E. C. H.; RAST, J. P. The Immune System of Echinoderms. Em: **Encyclopedia of Immunobiology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 1p. 462–467.

HOLMSTROM, T. H. et al. ODM-203, a selective inhibitor of FGFR and VEGFR, shows strong antitumor activity, and induces antitumor immunity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 1, p. 28–38, 2019.

ISAZADEH, A. et al. Pattern-recognition receptors (PRRs) in SARS-CoV-2. **Life Sciences**, v. 329, p. 121940, 2023.

JAMBECK, J. R. ET AL. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 2015.

JOHNSON, P. T. The Coelomic Elements of Sea Urchins (*Strongylocentrotus*) III. In Vitro Reaction to Bacterial. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 13, n. 1, p. 42–62, 1969.

KARP, R. D.; HILDEMANN, W. H. Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. **Transplantation**, v. 22, n. 5, p. 434–439, 1976.

KATSUMITI, A. ET AL. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles to mussel hemocytes and gill cells in vitro: Influence of synthesis method, crystalline structure, size and additive. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 5, p. 543–553, 2015.

KIELKOPF, C. L.; BAUER, W.; URBATSCH, I. L. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. **old Spring Harbor protocols**, v. 4, p. 102269, 2020.

KLAINE, S. J. et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1825–1851, 2008.

KOELMANS, A. A.; BESSELING, E.; SHIM, W. J. Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. **Marine Anthropogenic Litter**, p. 325–340, 2015.

KOLE, J. P. et al. Wear and tear of tyres: A stealthy source of microplastics in the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, 2017.

KROTO, H. W. ET AL. C₆₀: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, p. 162–163, 1985.

KUKLA, S. P. et al. Exposure of adult sand dollars (*Scaphechinus mirabilis*) (Agassiz, 1864) to copper oxide nanoparticles induces gamete DNA damage. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 26, p. 39451–39460, 2022.

KUN XING; HONGSHENG YANG; MUYAN CHEN. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. **Aquatic Biology**, v. 2, p. 85–92, 2008.

LAI, H.; LIU, X.; QU, M. Nanoplastics and Human Health: Hazard Identification and Biointerface. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 8, p. 1298, 2022.

LAMICHHANE, G. et al. Microplastics in environment: global concern, challenges, and controlling measures. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 4673–4694, 2023.

LAWRENCE, J. M. Functional biology of echinoderms. **Croom Helm**, v. 340, 1987.

LAWRENCE, J. M.; SAMMARCO, P. W. Effects of feeding on the environment: Echinoidea. Em: JANGOUX, M. (Ed.). **Echinoderm nutrition**, p. 499–519, 1992.

LEAD, J. R.; WILKINSON, K. J. Aquatic colloids and nanoparticles: Current knowledge and future trends. **Environmental Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 159–171, 2006.

LEE, Y. K. et al. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 97–113, 2014.

LI, C. et al. Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 49, n. 1, p. 190–197, 2015.

LI, F. et al. Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 77, p. 112–119, 2018.

LUNDQUIST, J. J.; TOONE, E. J. The cluster glycoside effect. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 555–578, 2002.

PINSINO, A.; ALIJAGIC, A. Silver nanoparticles and dissolved silver activate contrasting immune responses and stress-induced heat shock protein expression in sea urchin. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1872–1886, 2017.

MANDAI, K. et al. Nectins and Nectin-Like Molecules in Development and Disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 112, p. 197–231, 2015.

MANZO, S.; SCHIAVO, S. Physical and chemical threats posed by micro(nano)plastic to sea urchins. **Science of The Total Environment**, v. 808, p. 152105, 2022.

MARISA, I. et al. Invitro exposure of haemocytes of the clam *Ruditapes philippinarum* to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles: Nanoparticle characterisation, effects on phagocytic activity and internalisation of nanoparticles into haemocytes. **Marine Environmental Research**, v. 103, p. 11–17, 2015.

MARQUES-SANTOS, L. F. et al. ABCB1 and ABCC1-like transporters in immune system cells from sea urchins *Echinometra lucunter* and *Echinus esculentus* and oysters *Crassostrea gasar* and *Crassostrea gigas*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 195–203, 2017.

MARTIN, L. M. A. et al. Materials, surfaces, and interfacial phenomena in nanoplastics toxicology research. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118442, 2022.

MATRANGA, V. et al. Monitoring Chemical and Physical Stress Using Sea Urchin Immune Cells. **Progress in molecular and subcellular biology**, v. 39, p. 85–110, 2005.

MAZUR, A. A.; ZHURAVEL, E. V.; SLOBODSKOVA, V. V. ET AL. Waterborne Exposure of Adult Sand Dollar, *Scaphechinus Mirabilis* (Agassiz, 1864), to Zinc Ions and Zinc Oxide Nanoparticles Affects Early Development of its Offspring. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 115, 2020.

MECHNIKOFF, E. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. **Masson**, 1892.

MECHNIKOFF, E. Immunity in infective diseases. **Reviews of infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 223–227, 1988.

MEHENNAOUI, K. et al. Do the pristine physico-chemical properties of silver and gold nanoparticles influence uptake and molecular effects on *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda)? **Science of The Total Environment**, v. 643, p. 1200–1215, 2018.

MELVILLE, R. V. et al. Part U, Echinodermata 3. **Treatise on Invertebrate Paleontology**, v. 1,2, n. 3, p. 211–366, 1966.

MILLOTT, N. Injury and the axial organ of Echinoids. **Exerientia**, v. 25, p. 756–757, 1969.

MINETTO, D.; VOLPI GHIRARDINI, A.; LIBRALATO, G. Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C₆₀ engineered nanoparticles: An overview. **Environment International**, v. 92–93, p. 189–201, 2016.

MONOPOLI, M.; ÅBERG, C.; SALVATI, A. ET AL. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature Nanotechnology volume**, v. 7, p. 779–786, 2012.

MOOI, R.; DAVID, B. Radial symmetry, the anterior/posterior axis, and echinoderm hox genes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 43–62, 2008.

MOTOKAWA, T. Connective tissue catch in echinoderms. **Biological Reviews**, v. 59, p. 255–270, 1984.

MURANO, C. ET AL. Interplay Between Nanoplastics and the Immune System of the Mediterranean Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. **Marine Pollution**, v. 8, 2021.

NAPPER, I. E.; THOMPSON, R. C. Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges. **Global Challenges**, v. 4, n. 6, 2020.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, 2012.

OREN, M. et al. Individual Sea Urchin Coelomocytes Undergo Somatic Immune Gene Diversification. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1298, 2019.

PALMEIRA-PINTO, L. et al. Alterations induced by titanium dioxide nanoparticles

(nano-TiO₂) in fertilization and embryonic and larval development of the tropical sea urchin *Lytechinus variegatus*. **Marine Environmental Research**, v. 188, p. 106016, 2023.

PAUL, C. R. C. Early echinoderm radiation. Em: HOUSE, M. R. (Ed.). **The Origin of Major Invertebrate Groups**. Systematics Association. London: Academic Press, v. 12p. 415–434, 1979.

PAWSON, D. L. Phylum Echinodermata*. **Zootaxa**, v. 1668, p. 749–764, 2007.

PECHENIK, J. A. Equinodermos. Em: PECHENIK, J. A. (ORG.) (Ed.). **Biologia dos invertebrados**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, p. 496–521, 2016.

PIKULA, K. ET AL. Toxicity of Carbon, Silicon, and Metal-Based Nanoparticles to Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*. **Nanomaterials (Basel)**, v. 10, n. 9, p. 1825, 2020.

PINSINO, A. et al. Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signalling pathway. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

PINSINO, A.; ALIJAGIC, A. Sea urchin *Paracentrotus lividus* immune cells in culture: formulation of the appropriate harvesting and culture media and maintenance conditions. **Biology open**, v. 8, n. 3, 2019.

PLEE, T. A.; POMORY, C. M. Microplastics in sandy environments in the Florida Keys and the panhandle of Florida, and the ingestion by sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) and sand dollars (Echinodermata: Echinoidea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, p. 111437, 2020.

PLEUVRY, B. J. Hysteresis in Drug Response. Anaesth. **Intensive Care Med.**, v. 9, p. 372–373, 2008.

PRAETORIUS, A. et al. Strategies for determining heteroaggregation attachment efficiencies of engineered nanoparticles in aquatic environments. . **Environmental Science: Nano**, v. 7, p. 351–367, 2020.

PRINCE, J. Limited effects of the sea urchin *Echinometra mathaei* (de Blainville) on the recruitment of benthic algae and macroinvertebrates into intertidal rock platforms at Rottnest Island, Western Australia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 186, p. 237–258, 1995.

QUEIROZ, V. et al. Comparative study of coelomocytes from *Arbacia lixula* and *Lytechinus variegatus*: Cell characterization and in vivo evidence of the physiological function of vibratile cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 110, p. 1–9, 2021.

QUEIROZ, V. et al. Comparative evaluation of coelomocytes in *Paracentrotus* sea urchins: Description of new cell types and insights on spherulocyte maturation and sea urchin physiology. **Zoologischer Anzeiger**, v. 300, p. 27–40, 2022.

QUEIROZ, V.; CUSTÓDIO, M. R. Characterisation of the spherulocyte subpopulations in *Eucidaris tribuloides* (Cidaroida: Echinoidea). **Italian Journal of Zoology**, v. 82, n. 3, p. 338–348, 2015.

RAMÍREZ-GÓMEZ, F.; GARCÍA-ARRARÁS, J. E. Echinoderm immunity. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, p. 211–220, 2010.

RATTER, J. M. et al. In vitro and in vivo effects of lactate on metabolism and cytokine production of human primary PBMCs and monocytes. . **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2564, 2018.

ROCHA, A. C. et al. Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Research**, v. 161, p. 354–363, 2018.

RUBERTI, N. et al. Intensive Sea urchin harvest rescales *Paracentrotus lividus* population structure and threatens self-sustenance. **PeerJ**, v. 11, p. 16220, 2023.

SARLY, M. S. et al. Use of the gonadal tissue of the sea urchin *Paracentrotus lividus* as a target for environmental contamination by trace metals. **Environmental science and pollution research international**, v. 30, n. 38, p. 89559–89580, 2023.

SARTORI, D. et al. Increased sensitivity of sea urchin larvae to metal toxicity as a consequence of the past two decades of Climate Change and Ocean Acidification in the Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 194, p. 115274, 2023.

SERRÃO, C.; MARQUES-SANTOS, L. F. The genus *Artemia*, the nanoplastics, the microplastics, and their toxic effects: a review. **Environmental science and pollution research international**, v. 30, n. 35, p. 83025–83050, 2023.

SERVICE, M.; WARDLAW, A. C. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). **Biochem. Physiol**, v. 79, n. 2, p. 161–165, 1984.

SMITH, A. B. Classification of the Echinodermata. **Palaeontology**, v. 27, p. 431–459, 1984.

SMITH, A. B.; GHIOLD, J. Roles for holes in sand dollars (Echinoidea): a review of lunule function and evolution. **Paleobiology**, v. 8, n. 3, p. 242–253, 1982.

SMITH, L. C. et al. Echinoderm Immunity. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 708, p. 260–301., 2010.

SMITH, L. C.; DAVIDSON, E. H. The echinoderm immune system. Characters shared with vertebrate immune systems and characters arising later in deuterostome phylogeny. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 712, p. 213–226, 1994.

SMITH, L. C. ET AL. Correction to: Echinodermata: The complex immune system in Echinoderms. In. *Advances in comparative immunology*. **Springer International Publishing**, p. 409–501, 2018.

SODERGREN, E. et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 941–952, 2006.

SPRINKLE, J.; GUENSBURG, T. E. Early radiation of echinoderms. **The Paleontological Society Papers**, v. 3, p. 205–224, 1997.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 3, p. 1–3, 2015.

TACCONI, S. et al. Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles (NH₂-MSiNPs) impair the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 103956, 2022.

TELFORD, M. An experimental analysis of lunule function in the sand dollar *Mellita quinquiesperforata*. **Marine Biology**, v. 76, p. 125–134, 1983.

THOMAS, P. J. et al. Resolving the effects of environmental micro- and nanoplastics exposure in biota: A knowledge gap analysis. **Science of The Total Environment**, v. 780, p. 146534, 2021.

TOMMASI, L. R. Os Echinodermata do litoral de São Paulo - I. Echinoidea, Crinoidea e Holothurioidea do bentos costeiro. **Papéis do Departamento de Zoologia da Secretaria de Agricultura de São Paulo**, v. 13, n. 12, p. 19–44, 1957.

TOMMASI, L. R. Echinodermata do Estado do Rio de Janeiro-I. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 31, n. 4, p. 601–604, 1960.

TOMMASI, L. R. Observações sobre Equinóides do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 1964c, 24, n. 1, p. 83–93, 1964.

TOMMASI, L. R. Lista dos Equinóides recentes do Brasil. Contribuições do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo,. **Série Oceanografia Biológica**, v. 11, p. 50, 1966.

TOMMASI, L. R. Echinodermata Recentes e Fósseis do Brasil. **Invertebrados Marinhos Registrados no Litoral Brasileiro**, 1999.

TOMŠIĆ, S. et al. Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). **Acta Adriatica**, v. 51, n. 1, p. 67–77, 2010.

TORRES-DUARTE, C. et al. Stage specific effects of soluble copper and copper oxide nanoparticles during sea urchin embryo development and their relation to intracellular copper uptake. **Aquatic Toxicology**, v. 189, p. 134–141, 2017.

VABULAS, R. M. et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the toll-like receptor 2/4 pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20847–20853, 2002.

VENTURA, C. R. ET AL. Filo Echinodermata. Em: LAVRADO, H. P. ; I. B. L. (Ed.).

Biodiversidade bentônica da costa central da Zona Econômica Exclusiva brasileira. Rio de Janeiro: Museu Nacional, v. 18, p. 339–389, 2006.

VENTURA, C. R. R. Filo Echinodermata. Em: FRANSOZO, A. ; N.-F. M. L. (Ed.). **Zoologia dos invertebrados**. 1. ed. Roca, p. 562–577, 2018.

VENTURA, C. R. R. ET AL. Filo Echinodermata. Em: LAVRADO H.P.; VIANA, M. S. (Ed.). **Atlas de invertebrados marinhos da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira, parte 1**. Museu Nacional, v. 25, p. 258, 2007.

HILDEMAN, W. H.; DIX, T. G. Transplantation reactions of tropical Australian echinoderms. **Transplantation**, v. 14, n. 5, p. 624–633, 1972.

WALCZYK, D. et al. What the cell “sees” in bionanoscience. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 16, p. 5761–5768, 2010.

WAN, J. K. et al. Distribution of Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Ecosystems and Their Impacts on Aquatic Organisms, with Emphasis on Microalgae. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 246, p. 133–158, 2018.

WANG, X. et al. A Mini Review on Carbon Quantum Dots: Preparation, Properties, and Electrocatalytic Application. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 2019.

WILKINS, E. M. et al. Temperature influences immune cell development and body length in purple sea urchin larvae. **Marine Environmental Research**, v. 202, p. 106705, 2024.

WRAY, G. A.; RAFF, R. A. Evolutionary Modification of Cell Lineage in the Direct-Developing Sea Urchin *Heliocidaris erythrogramma*. **Developmental Biology**, v. 132, p. 458–470, 1989.

YERUHAM, E.; RILOV, G.; SHPIGEL, M. Collapse of the echinoid *Paracentrotus lividus* populations in the Eastern Mediterranean—result of climate change? **Scientific Reports**, v. 5, p. 13479, 2015.

ZAKI, M. R. M.; ARIS, A. Z. An overview of the effects of nanoplastics on marine organisms. **Science of The Total Environment**, v. 831, p. 154757, 2022.

ZAPATA-VÍVENES, E. et al. Colorless spherule cells and lysozyme contribute to innate immunological responses in the sea urchin *Lytechinus variegatus*, exposed to bacterial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 117, p. 253–261, 2021.

ZHANG, W. et al. Transcriptome sequencing reveals phagocytosis as the main immune response in the pathogen-challenged sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 94, p. 780–791, 2019.