

RESPOSTA IMUNE INESPECÍFICA DE ANIMAIS ECTOTÉRMICOS ANTÁRTICOS SOB TEMPERATURAS POLARES

José Roberto Machado Cunha da Silva^{1*}, Bruno Cossermelli Vellutini¹, Laércio Ribeiro Porto Neto¹, Leandro Nogueira Pressinotti¹, Maurício de Carvalho Ramos^{2**}, Edwin L. Cooper³, Francisco Javier Hernandez-Blazquez⁴, Bernard Ernesto Jensch-Junior[†] & João Carlos Shimada Borges¹

¹ Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil – telefone: 55 11 – 3091 7223, fax: 55 11 – 3091 7402.

² Departamento de Filosofia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Sociais, Universidade de São Paulo – Brasil.

³ Laboratory of Comparative Neuroimmunology, Department of Neurobiology, David Geffen School of Medicine at UCLA – University of California, Los Angeles, California 190095-4763-US.

⁴ Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-Brasil

[†] Em memória

E-mails: * jrmcs@usp.br, ** maucramos@yahoo.com.br

RESUMO

Esta revisão tem por objetivo apresentar os dados sobre a imunidade inespecífica de metazoários pecilotérmicos antárticos obtidos por nosso grupo de pesquisa com animais antárticos. Trataremos em particular dos processos de fagocitose, inflamação e cicatrização em peixes antárticos popularmente chamados “cabeçudas” (*Notothenia coriiceps* = *N. neglecta*), em estrelas-do-mar antárticas (*Odontaster validus*) e em ouriços-do-mar antárticos (*Sterechinus neumayeri*).

Palavras-chaves: Fagocitose, inflamação, cicatrização, resposta imune inespecífica, Antártica.

ABSTRACT

UNSPECIFIC IMMUNE RESPONSE OF ANTARCTIC ECTOTERMIC ANIMALS UNDER POLAR TEMPERATURES. This review presents data on nonspecific immune system of Antarctic metazoans poekilotherms. The phagocytosis, inflammation and wound repair were analysed in Antarctic animals, the big head fish (*Notothenia coriiceps* = *N. neglecta*), Antarctic starfish (*Odontaster validus*) and in Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*).

Key-Words: Phagocytosis, inflammation, wound repair, immune response, Antarctic

INTRODUÇÃO

A descoberta do significado biológico da fagocitose por Elie Metchnikoff (1845-1916) está intimamente ligada à história da noção de *self* no sentido de um indivíduo dotado de unidade e identidade biológica. Metchnikoff também criou a imunologia tal como a concebemos hoje. Segundo sua biografia, escrita por Olga, sua segunda esposa (Metchnikoff 1921), tudo começou com um experimento com equinodermos. No final do século passado, este biólogo (embriologista e zoólogo), interessado no estudo de aspectos da nutrição e da embriologia, observou em uma estrela-do-mar a migração celular seguida de fagocitose como um processo ativo em resposta a um estímulo. Assim, demonstrou o significado biológico da migração de células celomáticas para o foco inflamatório (Metchnikoff 1891, Chernyak & Tauber 1988, Tauber

& Chernyak 1991, Tauber 1994). A partir de suas observações criou o conceito de fagocitose (do gr. *phagein*, comer) como o entendemos atualmente.

A fagocitose é parte integrante e fundamental do processo inflamatório, participando na remoção do tecido necrótico e de *debris* celulares e na remodelação tecidual. Durante o processo inflamatório, o agente fagocítico é bastante diversificado, podendo apresentar variações morfológicas, ontogenéticas e em sua cinética, como mostraram nossos resultados científicos. Na cabeçuda (*Notothenia coriiceps*), os macrófagos foram as células preponderantes (Silva *et al.* 1998b, 1999), nos equinodermos (adultos em geral) foram os amebócitos fagocíticos (Mangiaterra & Silva 2001, Borges *et al.* 2002, Tajima *et al.* 2007), no embrião do ouriço-do-mar as células mesenquimatosas, que assumem a fagocitose de corpos estranhos já nas fases iniciais da gástrula (Silva 2000, 2001).

No anfioxo, encontramos um problema em relação ao paradigma da imunologia celular, pois, como propôs Metchnikoff, se a inflamação é a migração celular seguida de fagocitose, não temos inflamação neste animal, uma vez que é desprovido de fagócitos circulantes. O papel destas últimas é assumido pelas células endoteliais locais, que fagocitam os *debris* durante a cicatrização (Silva *et al.* 1995, 1998a).

A cinética do processo inflamatório também é bastante variável entre os diferentes modelos animais estudados, assim como num mesmo animal sob diferentes estímulos. Por exemplo, os dados obtidos com diferentes estímulos em peixes antárticos, mostraram uma diferença qualitativa dos fagócitos envolvidos após diferentes estímulos irritantes como fio de sutura catagute e parasitas mortos (Silva *et al.* 1999). Os prazos de reação variaram bastante conforme a temperatura ambiente, sendo bastante evidentes quando se comparam os dados das cabeçudas (antárticas) com os dados obtidos para peixes tropicais: as fases agudas são muito mais longas nos animais antárticos. Outro dado interessante foi a diferença obtida entre os índices fagocíticos de estrelas-do-mar antárticas (*Odontaster validus*) realizados em animais em meses diferentes, e sendo um dos grupos animais mantidos em cativeiro por alguns meses (Silva & Peck 2000, Silva *et al.* 2001).

A inflamação ou processo inflamatório (do grego *phlogosis*, calor, e do latim *flamma*, fogo), reveste-se de grande importância médica por ser um substrato morfo-fisiológico de mais de 70% das patologias que ocorrem no homem e nos animais domésticos. Papiros egípcios de 2.000a.C. já se referem à inflamação ao relatarem a formação de pus. Esse fenômeno é caracterizado pelos clássicos sinais de rubor, tumor, calor e dolor (dor), descritos por Cornelius Celsus no primeiro século depois de Cristo e pela *functio laesa*, (perda de função) adicionado por Virchow no final do século XIX (Tauber & Chernyak 1991). Manifesta-se sempre que agentes químicos, físicos ou biológicos alteram a homeostase do tecido conjuntivo. Os mecanismos que regem o processo inflamatório continuaram desconhecidos e o fenômeno foi mal interpretado por séculos após as observações de Celsus. Ainda no século XVIII, boa parte dos naturalistas acreditava que a inflamação fosse uma doença ou uma consequência desta. Foi somente em 1739 que o famoso cirurgião inglês John Hunter postulou

que a inflamação era uma resposta não específica e salutar para o hospedeiro. Somente no século XIX, alguns aspectos fundamentais da fisiopatologia da inflamação foram estabelecidos. Julius Cohnheim foi o primeiro a trazer inquestionáveis evidências de que os vasos sanguíneos desempenham um papel central na dinâmica inflamatória. Outra contribuição fundamental para a compreensão do processo foi dada, em 1875, por Arnold, ao mostrar que num tecido lesado, as células sanguíneas migravam por entre as células endoteliais atingindo o local estimulado. A presença de células sanguíneas no foco inflamatório foi claramente estabelecida por Almroth Wigert em 1889. Mesmo as células presentes no exudato inflamatório sendo caracterizadas como oriundas do sangue, o significado biológico da migração celular para a fisiologia da inflamação permaneceu desconhecido até os trabalhos de Metchnikoff, que permitiram a inversão do paradigma: de uma imunidade passiva do hospedeiro, passou-se a considerar o processo ativo, ou seja, a imunidade como conhecemos hoje, desencadeadas pela migração de células sanguíneas para o foco inflamatório.

Após ter observado que algumas células presentes na cavidade celomática e tecido mesenquimal de invertebrados tinham capacidade para movimentar-se e para, freqüentemente, internalizar partículas inertes ou mesmo vivas, Metchnikoff suspeitou que esse fenômeno poderia estar relacionado com a eliminação de antígenos dos tecidos. O início da comprovação de sua hipótese deu-se em 1882 com experimentos simples, porém contundentes. Imaginou que, inserindo um corpo estranho num animal, aquelas células móveis que havia observado no mesênquima migrariam em direção ao agente “agressor” na tentativa de englobá-lo e “destruí-lo”. Como primeiro experimento para demonstrar essa hipótese inseriu a pontinha de um acúleo de roseira em uma larva de estrela-do-mar e observou que, passadas aproximadamente 12 horas, os amebócitos haviam migrado em direção ao corpo estranho tentando ingeri-lo. Com esse simples experimento criou o conceito de fagocitose. Nomeou as células pequenas que participavam do processo como micrófagos (do grego *mikros*, pequeno) e as grandes como macrófagos (do grego *makros*, largo): “Eu fiz o uso do termo fagocitose para designar células amebóides capazes de capturar e digerir microorganismos e outros elementos. A teoria

baseada nessa propriedade das células defensivas, eu dei o nome de Teoria da Fagocitose” (Metchnikoff 1891). A relevância de seus trabalhos para a medicina deu ao biólogo russo o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1908, juntamente com Paul Ehrlich, o pai da teoria humoral dos mecanismos de defesa do organismo contra infecções. Com a Teoria da Fagocitose nasceu a imunologia celular (Metchnikoff 1891, 1921, Tauber & Chernyak 1991).

Atualmente, a fagocitose é considerada a resposta celular na qual os fagócitos, através de movimentos amebóides, ingerem partículas maiores que 0,5µm utilizando mecanismos que envolvem a polimerização de filamentos de actina (Rabinovitch 1995). É observada nos metazoários e é um dos mecanismos responsáveis pela degradação de microorganismos, assim como de partículas poluentes e irritantes. É considerado um mecanismo chave para o sistema de defesa dos organismos, bem como no processo inflamatório em resposta a estímulo irritante, para a remodelação tecidual (Metchnikoff 1891, Silva *et al.* 1995, 1998b) e para a reinternalização da membrana citoplasmática (Rabinovitch 1995).

Os cem anos que se seguiram à descoberta da fagocitose trouxeram um volume inestimável de informações sobre as funções dos macrófagos e micrófagos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) na fisiologia e na patologia, principalmente do homem e de outros vertebrados. Assim, está hoje estabelecido o papel central que os macrófagos desempenham na inflamação, na resistência natural às infecções, na eliminação de substâncias e células alteradas como lipoproteínas, hemácias e células neoplásicas, na embriogênese e no envelhecimento para citar apenas alguns exemplos (Clem *et al.* 1985, Donaldson & Mahan 1988),

Em invertebrados, o volume de dados sobre a fagocitose é ínfimo, quando comparado com as publicações de dados para os mamíferos. Recentemente encontramos boas revisões comparativas das células circulantes (incluindo fagócitos) (Ratcliffe & Rowley 1981, Rowley & Ratcliffe 1988), que compara a estrutura com a função das mesmas. Os trabalhos pioneiros de Metchnikoff demonstraram a ingestão de diversos tipos de partículas pelos celomócitos (leucócitos) de diferentes espécies de equinodermos. As partículas capturadas incluem bactérias, partículas inertes, corpos estranhos e células senescentes (Boooloatian & Giese 1958, Johnson 1969a, b, Ellis

1977, Bertheussen & Seljelid 1978, Hobaus 1978, Isaeva & Korenbaum 1990, Blazer 1991, Secombes & Fletcher 1992, Stein & Keshav 1992, Suzuki & Iida 1992, Zapata *et al.* 1992, Edds 1993, Chia & Xing 1996, Silva & Peck 2000, Silva *et al.* 2002). Para demonstrar que a fagocitose e a inflamação a ela associada seriam, como um todo, um fenômeno universal, Metchnikoff (1891) pesquisou a existência desses fenômenos em metazoários representantes de diversos filos.

Renomados autores (Tauber & Cherniak 1991) defendem Metchnikoff como o primeiro imunologista de fato, cujo trabalho original torna-o fundador da imunologia moderna. Metchnikoff foi o criador da teoria fagocítica através da qual as células defendem ativamente o corpo do hospedeiro contra patógenos e células degeneradas, tendo sido também o seu principal defensor. Seu programa de trabalho partiu de estudos de embriologia comparada que permitiram estabelecer relações genealógicas entre diferentes espécies dentro do novo paradigma darwiniano.

O conceito de imunologia criado por Metchnikoff, apesar de não ser reconhecido unanimemente por muitos autores como contribuição original, foi incorporado por seus opositores nas décadas subsequentes, ironicamente para combatê-lo, mas sempre utilizando a metáfora do *self* e do mecanismo de defesa ativo por parte do hospedeiro.

Devido à grande oposição que as idéias de Metchnikoff obtiveram, ele acabou tornando-se um grande opositor da teoria humoral que, de certa forma, procurava substituir sua teoria celular. Como, no final do século XIX e início do século XX, ambas as teorias apresentavam resultados experimentais consistentes, Elie Metchnikoff e Paul Ehrlich foram premiados com o Nobel em 1908 por suas descobertas e trabalhos. As duas teorias tiveram que esperar mais algumas décadas para, somente na década de 50 do século XX, serem unificadas.

É interessante notar que os atuais livros de texto relegam Metchnikoff a um plano secundário na imunologia, talvez por sua oposição à teoria humoral e à sua crença de que os fagócitos são os únicos elementos do sistema imune (posição somente assumida após as intensas críticas que recebeu). A imunologia moderna está intimamente associada ao estudo dos anticorpos do sistema complemento e dos

linfócitos e seus produtos e, talvez pela associação do nome de Metchnikoff à fagocitose, tenham ofuscado a sua fundamental contribuição na construção do paradigma que é o pilar da imunologia moderna.

O trabalho de filósofos da ciência como Alfred Tauber procura entender de forma clara e concisa como as principais correntes filosóficas e científicas do final do século XIX chegaram até os tempos modernos através de uma genealogia das idéias de tolerância imune (Tauber & Cherniak 1991).

INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório foi tomado como ponto de partida, com os trabalhos com o anfióxico, que é uma exceção ao paradigma da Teoria Fagocítica: um animal que não inflama. Metchnikoff não foi capaz de induzir o processo inflamatório no anfióxico, conforme sua revisão publicada “Lectures of Comparative Pathology of Inflammation” (Metchnikoff 1891), o que foi confirmado em nossos estudos (Silva *et al.* 1995). Neste contexto, elegemos a definição de inflamação proposta por Metchnikoff, migração celular seguida de fagocitose, como a mais adequada para o estudo dos metazoários, uma vez que as definições que incluem o sistema vascular não se aplicam a muitos

filos de invertebrados que possuem circulação aberta e cavidades celomáticas.

Por estes motivos, elegemos o peixe antártico *Nothotenia coriiceps* (= *N. neglecta*) para estudar a inflamação pela primeira vez, sob temperaturas polares (Silva *et al.* 1998a, Silva *et al.* 1999).

FAGOCITOSE

Dado o vínculo entre inflamação e o conceito de fagocitose que adotamos, passamos a investigar o segundo processo em si em diferentes modelos de animais deuterostômios ectotérmicos polares, mais especificamente em peixes (*Nothotenia coriiceps*) (Silva *et al.* 1999, 2000, 2002), estrelas-do-mar (*Odontaster validus*) (Silva & Peck 2000, Silva *et al.* 2001) e ouriços do mar (*Sterechinus nemuayeri*) (Borges *et al.* 2002).

CICATRIZAÇÃO

A capacidade dos seres vivos em manter sua integridade física é considerada um fenômeno essencial para a manutenção da vida, mas tal propriedade se expressa de modo filogeneticamente variável. A fagocitose está diretamente envolvida nos

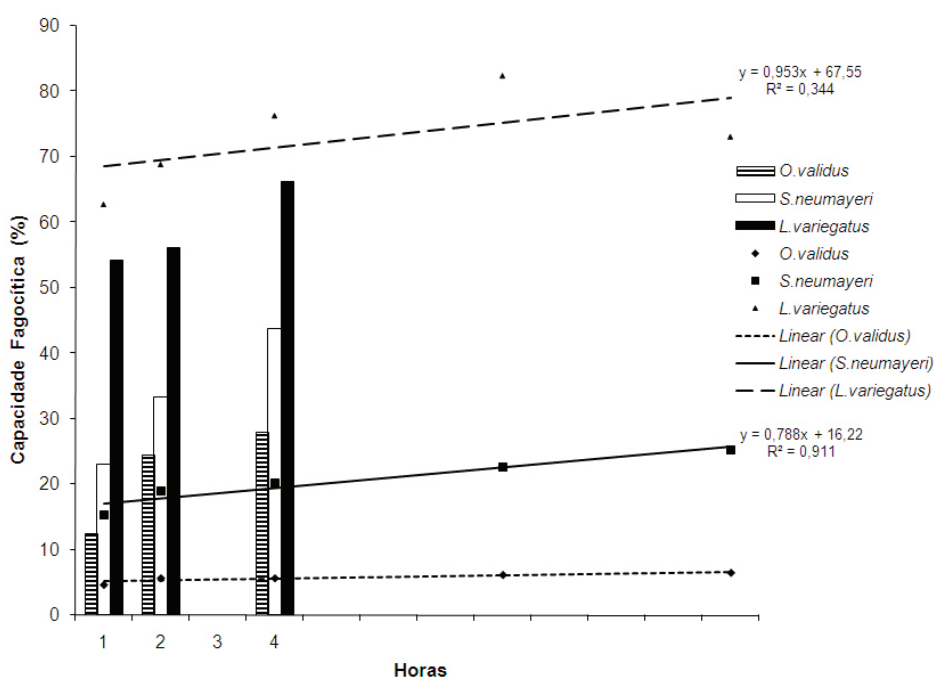


Figura 1. Dados comparativos sobre a capacidade fagocítica de peixes antárticos (*Nothotenia coriiceps*) e tropicais (*Prochilodus scrofa*), assim como ouriço do mar antártico (*Sterechinus nemuayeri*) e tropical (*Lytechinus variegatus*) e a estrela do mar antártica (*Odontaster validus*) ao longo do tempo em horas.

processos decorrentes da capacidade que os animais possuem de manter a integridade do tegumento após uma lesão. A maneira pela qual estes animais realizam os processos de cicatrização e regeneração para manterem sua integridade entre o ambiente interno (animal) e o externo (meio) também foi objeto de nossos estudos (Silva *et al.* 2002, Silva *et al.* 2004).

O processo inflamatório pode ser considerado como uma fase inicial da restituição tecidual, mais especificamente, da cicatrização. A importância da resposta inflamatória reside em muitos aspectos, tais como a provisão de células importantes para a remoção de *debris* celulares, a preparação para responder a uma possível infecção bacteriana, a secreção de substâncias necessárias para estimular a migração de fibroblastos (necessários para síntese de matriz extracelular) e proliferação de outras células (como as epiteliais, a partir das suas precursoras na camada basal); enfim, de quase todas as fases subseqüentes da reparação das lesões (Silva *et al.* 2004). A restituição tecidual sempre visa o fechamento da área lesada, selando-a, se necessário, com uma cicatriz, e retomando sempre que possível, sua função original (Silva 1998a).

No entanto, apesar de organizada e, até certo ponto, estereotipada, a restituição tecidual depende de inúmeros outros fatores, tanto locais (como volume de tecido lesado ou perdido, presença de contaminação bacteriana, forças mecânicas, presença de corpo estranho), quanto sistêmicos (perfusão sanguínea adequada, nutrição equilibrada, inervação existente na área, doenças intercorrentes). Todos esses fatores determinarão em conjunto a maneira pela qual uma área ou estrutura lesada será restituída.

A descrição do modo como ocorre o desenvolvimento do processo inflamatório inicial durante a evolução da restituição tecidual e a descrição da mesma em modelos experimentais são de extrema importância. Nesse contexto, encontramos na literatura trabalhos que se concentram na restituição de lesões após pequenas incisões na pele e nas reações de defesa (sistema imune) contra patógenos ou trabalhos que estudam o substrato de migração das células da epiderme, utilizando espécies e técnicas variadas para o melhor entendimento do processo cicatricial da pele e da regeneração de animais ectotérmicos.

Alguns autores afirmam que a intensidade e a velocidade de recuperação de lesões em vertebrados pecilotérmicos (ectotérmicos) varia conforme a

temperatura ambiente que atua como um fator regulador do processo inflamatório (Finn & Nielsen 1971, Grout & Morris 1987, Silva *et al.* 2002).

Foi realizado um estudo da cicatrização em *N. coriiceps* pela primeira vez (Silva *et al.* 2004, 2005), sendo o primeiro estudo de cicatrização sob temperaturas polares em ectotérmicos.

No ambiente marinho antártico, a temperatura da água é, em geral, próxima de 0°C, indo predominantemente de -1,9°C a +2,0°C (Clarke & Leakey 1996). A maioria dos processos fisiológicos são muito reduzidos ou modificados nestas condições (Grout & Morris 1987, MacDonald *et al.* 1987, Hernandez-Blazquez & Silva 1998).

PORQUE ESTUDAR A IMUNIDADE INESPECÍFICA EM ANIMAIS ANTÁRTICOS

A Antártica é um dos ambientes extremos de temperatura do planeta. Ao falarmos da temperatura em ectotérmicos, este efeito pode ser dramático, uma vez que as reações enzimáticas possuem um ótimo de temperatura que pode variar dentro de certos limites biológicos (Finn & Nielsen 1971). Assim, elegemos espécies de metazoários que ocorrem em ambientes tropical e polar, regiões em que o limite biológico da vida varia segundo a maior latitude possível; também escolhemos as espécies pela relativa facilidade de coleta e manutenção em laboratório dos exemplares. Por circunstâncias diversas e pelas adaptações que os animais que lá vivem apresentam, escolhemos a Antártica. Procurando espécies que tivessem uma distribuição nas grandes latitudes, podendo assim comparar animais colhidos numa região sub-antártica (Ilha Rei George), com fauna antártica (Fischer & Hureau 1985, Gon & Heemstra 1990).

METODOLOGIAS UTILIZADAS

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA (CF) E ÍNDICE FAGOCÍTICO (IF) E CAPACIDADE GERMICIDA (CG)

Estes índices foram calculados utilizando-se microscopia de contraste de fase ou Nomarsky (D.I.C.), que permitiram visualizar quando as leveduras encontravam-se fagocitadas ou simplesmente aderidas aos macrófagos ou amebócitos fagocíticos distribuídos nas lamínulas ou diretamente sobre lâminas de vidro.

Nos peixes foi utilizado o meio de cultura DEMEN como meio e para os celomócitos água do mar.

Capacidade Fagocítica (CF), porcentagem dos macrófagos que estão fagocitando.

$$CF = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células fagocitando}}{100 \text{ fagócitos}}$$

Índice Fagocítico (IF), é número médio de leveduras no interior dos células fagocitando (contagem de 100 células)

$$IF = \frac{\text{n}^\circ \text{ de leveduras no interior dos fagócitos}}{\text{n}^\circ \text{ de células fagocitando}}$$

Capacidade Germicida

$$CG = \frac{\text{n}^\circ \text{ de leveduras mortas} \times 100}{25 \text{ leveduras fagocitadas}}$$

CICATRIZAÇÃO

Para o estudo da cicatrização cutânea nas cabeçudas (*Notothenia coriiceps*), foram realizadas, após anestesia, incisões padronizadas para remoção de uma área de 4 cm² na região dorso lateral anterior e após diferentes prazos a lesão foi fotografada e amostras colhidas para histologia sob microscopia de luz e para estudos ultraestruturais.

RESULTADOS OBTIDOS COM AS RESPECTIVAS PUBLICAÇÕES

PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO

HISTOFISIOLOGIA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PEIXES ANTÁRTICOS (Silva *et al.* 1998a)

Foi estudado o processo inflamatório induzido no peixe antártico cabeçuda (*Notothenia neglecta* = *N. coriiceps*) a 0°C. Tinta da china foi injetada e um fio de sutura de algodão transpassado na musculatura após anestesia de diferentes grupos de peixes. Após 1-2 dias da injeção da tinta da china, a tinta estava difusa no perimísio do músculo e também foi observada hemorragia e um infiltrado inflamatório, constituído principalmente por macrófagos do tipo A (com poucos e pequenos lisossomos) e neutrófilos, após 7-15 dias observamos macrófagos tipo A e macrófagos do tipo B (citoplasma claro, sistema lamelar formando interdigitações); após 30 dias, não havia mais tinta da china no interior de macrófagos do tipo A. O processo inflamatório induzido pelo fio de sutura ocorreu em duas fases. A primeira (até 7 dias) com a predominância de macrófagos do tipo A. e poucos neutrófilos, e a Segunda fase (15-30 dias) com a predominância de macrófagos do tipo B. Podemos concluir que as cabeçudas responde a estímulos irritantes com um processo inflamatório, demonstrando a adaptação destes peixes ao ambiente antártico.

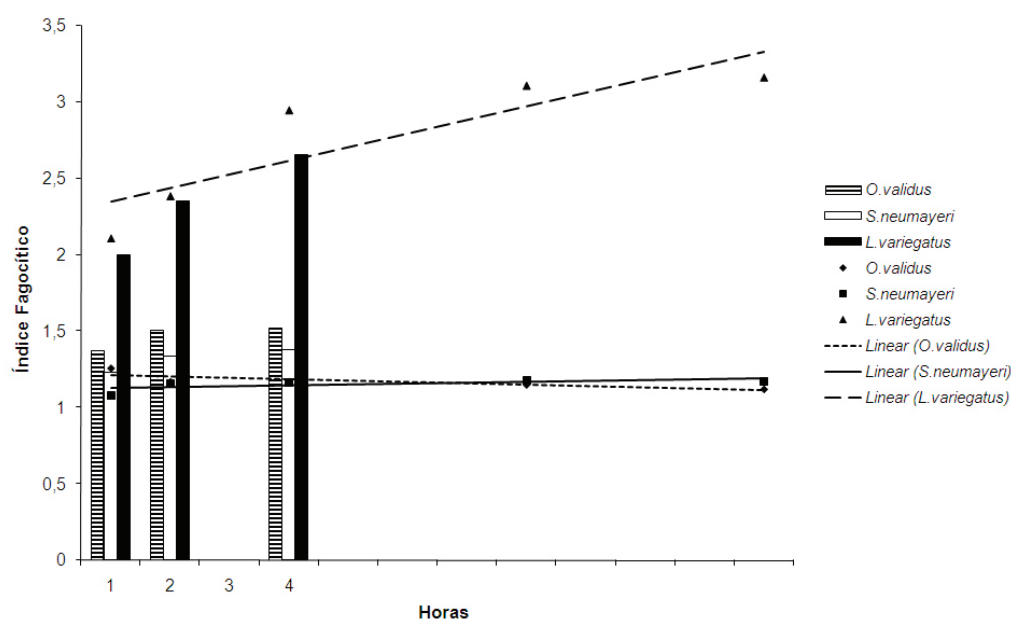


Figura 2. Dados comparativos sobre o índice fagocítico de peixes antárticos (*Notothenia coriiceps*) e tropicais (*Prochilodus scrofa*), assim como ouriço do mar antártico (*Sterechinus nemuayeri*) e tropical (*Lytechinus variegatus*) e a estrela do mar antártica (*Odontaster validus*) ao longo do tempo em horas.

HISTOFISIOLOGIA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA HEPÁTICA NO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia neglecta* (Silva *et al.* 2007)

O presente projeto teve como objetivo estudar a capacidade hepática de peixes antárticos *Notothenia neglecta* em responder ao fio de sutura “categute” e a parasitas mortos reimplantados neste tecido, observando e descrevendo as alterações ocorridas a nível tecidual. O material foi fixado e examinado em microscópico de luz sob diferentes técnicas de coloração. A resposta inflamatória induzida pelo parasito morto reimplantado e pelo fio de sutura implantado no parênquima hepático ocorreu com diferentes intensidades, sendo a resposta mais intensa para o fio categute e, em ambos os casos, verifica-se uma tentativa de encapsulamento do agente irritante através de células pavimentosas se sobrepondo. A resposta inflamatória induzida pelo fio de sutura categute no fígado e no tecido muscular são diferentes, sendo a primeira com predominância de granulócitos eosinófilos de 2 tipos e macrófagos, enquanto a segunda composta essencialmente por macrófagos e não apresentando uma tendência nítida ao encapsulamento nos prazos máximos observados. O aparecimento de plasmócitos foi bastante tardio, provavelmente em função das temperaturas Antárticas e se deu mais evidente nos animais que receberam

parasita morto intramuscular e categute no fígado, sugerindo uma resposta secundária mediada por anticorpos. Assim como a presença de eosinófilos principalmente no parênquima hepático após 7 dias, sugere a ação destes na eliminação de complexos Ag-Ac. Os nossos resultados mostram de forma clara e evidente que o peixe antártico *Notothenia neglecta* responde com migração celular às injúrias induzidas pelo fio de sutura categute e pelo parasito morto reimplantado, apesar da baixa temperatura ($1 \pm 2^\circ\text{C}$), caracterizando assim a capacidade da *N. neglecta* reconhecer os estímulos irritantes como material estranho, e estabelecer um processo inflamatório induzido por estes agentes. Numa intensidade superior do que seria esperado para um peixe de clima temperado mantido a esta temperatura. O processo inflamatório claramente esta adaptado ao frio dos mares antárticos em *N. neglecta*.

FAGOCITOSE

FAGOCITOSE E FORMAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES A 0°C DO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia coriiceps* (Silva *et al.* 2002)

Macrófagos aderentes a lamínulas circulares de vidro que foram implantadas na cavidade abdominal de *Notothenia coriiceps*, pescadas na baía do Almirantado, Ilha do Rei George, removidas e incubadas *in vitro*

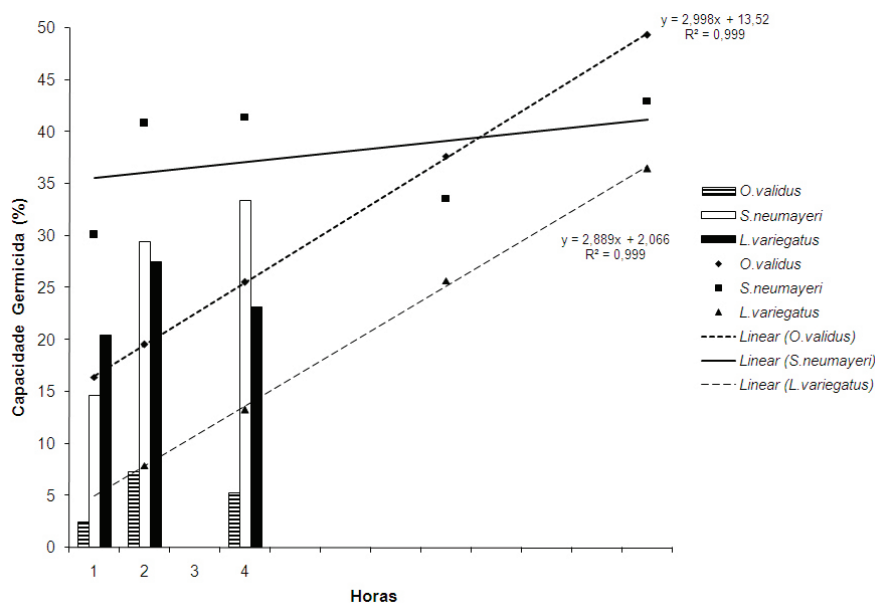


Figura 3. Dados comparativos sobre a capacidade germicida de peixes antárticos (*Notothenia coriiceps*) e tropicais (*Prochilodus scrofa*), assim como ouriço do mar antártico (*Strechinus nemuayeri*) e tropical (*Lytechinus variegatus*) e a estrela do mar antártica (*Odontaster validus*) ao longo do tempo em horas.

por 4h at 0°C em vários intervalos de tempo. Os macrófagos fagocitaram leveduras *Saccharomyces cerevisiae* suspensas em salina. Macrófagos bi nucleares foram primeiramente observados após 6h. A formação de células gigantes e sua atividade fagocítica foi observada em peixes que tiveram injetados com 1 ml de suspensão de Bacilo de Calmette e Guerin (BCG) - 24 horas antes da implantação das lamínulas que foram removidas após 15 dias de implantação. A fagocitose e a formação de células gigantes foi descrita pela primeira vez a 0°C num peixe antártico.

FAGOCITOSE E CAPACIDADE GERMICIDA DOS MACRÓFAGOS (MØ) IN VITRO DO PEIXE ANTÁRTICO Notothenia coriiceps A 0°C (Silva et al. 2005)

Exemplares de *Notothenia coriiceps* foram capturados na Baía do Almirantado na Ilha do Rei George. Os peixes foram anestesiados e lamínulas circulares de vidro foram implantadas na cavidade abdominal. Em um outro grupo 1 ml de Glicogênio de ostra foi injetado na cavidade abdominal 24 horas do implante das lamínulas. Após diferentes prazos de incubação (1, 2, 7 e 15 dias) as lamínulas foram removidas e incubadas durante 4 horas *in vitro* a 0°C com uma suspensão de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). As leveduras foram observadas sob microscopia de fluorescência e contraste de fase e contraste interferencial para o cálculo da capacidade fagocítica (CF), índice fagocítico (IF) e capacidade germicida (CG) dos MØ.

Os macrófagos fagocitaram em todos os prazos de incubação e não foram observadas diferenças significativas para a CF e para o IF, quando comparados os dois grupos experimentais. Apenas o grupo com glicogênio de ostra apresentou uma CG maior. Este estudo mostra pela primeira vez a capacidade germicida dos macrófagos de peixes antárticos, apesar da baixa temperatura em que vivem (0°C).

FAGOCITOSE INDUZIDA IN VITRO NA ESTRELA DO MAR ANTÁRTICA Odontaster validus A 0°C (Silva & Peck 1999)

Foi estudada a fagocitose utilizando o celoma perivisceral de estrelas do mar Antárticas *Odontaster validus* at 0°C. O número total de celomócitos foi

contado e a atividade fagocítica dos amebócitos fagocíticos (AF) quantificada após 1 e 2 horas de incubação *in vitro* utilizando-se leveduras de cerveja como estímulo. A porcentagem de AF fagocitando aumentou significativamente (teste de Wilcoxon) de 42,29% ± 10,50 (SD) após 1 hora para 52,57% ± 13,96 após 2 horas. O número de leveduras por AF também aumentou significativamente (teste de Wilcoxon) de 2,27 para 2,45 leveduras por AF, indicando que a atividade fagocítica foi mantida por algum tempo, possivelmente até o estímulo do corpo estranho ser removido. A ocorrência da fagocitose de um invertebrado Antártico foi mostrada por nosso grupo pela primeira vez e os tipos celulares envolvidos identificados. As taxas de fagocitose foram semelhantes ou superiores do que as previamente relatadas para estrelas do mar de climas temperados. Todavia esta conclusão deve ser cautelosa, uma vez que são raros os dados disponíveis para animais antárticos, além das diferentes metodologias utilizadas. Todavia os dados sugerem que o principal mecanismo de resistência natural à infecção destes animais (*O. validus*) está bem adaptado às baixas temperaturas. (Este trabalho foi realizado durante estágio de pós-doutoramento no BAS (British Antarctic Survey), na Inglaterra, com animais em cativeiro durante os meses de junho-julho).

ESTUDO COMPARATIVO DA FAGOCITOSE IN VIVO E IN VITRO, INCLUINDO A CAPACIDADE GERMICIDA EM Odontaster validus A 0°C (Silva et al. 2001)

A fagocitose e a capacidade germicida dos amebócitos fagocíticos (AF) da estrela do mar antártica *Odontaster validus* frente a leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram estudadas *in vivo* (após períodos de incubação de 1, 2 e 4 horas) e *in vitro* (após períodos de incubação de 1, 2, 4, 8 e 12 horas) a 0°C. O trabalho foi desenvolvido na Estação Antártica Comandante Ferraz. O número total de AF, assim como a capacidade fagocítica (CF), índice fagocítico (IF) e a capacidade germicida (CG) foram calculados. Os resultados mostram uma variação significativa (teste de Wilcoxon) do número de AF nos diferentes animais. Não ocorreu um aumento significativo da CF assim como da IF e CF entre os diferentes prazos de incubação. Os experimentos *In vivo* não mostraram

diferença significativa entre CF e IF, mas ocorreu um aumento significativo da CG com o aumento do período de incubação. Comparações entre os resultados *in vitro* e *in vivo* revelaram que a IF foi significativamente (teste de Wilcoxon) maior *in vitro* e que a CG foi significativamente maior *in vivo*. Este estudo mostrou pela primeira vez a fagocitose e a CG de um invertebrado Antártico *in vivo* sob temperaturas polares (0°C), discutindo os dados e comparando com a literatura disponível para equinodermos.

FAGOCITOSE IN VITRO E IN VIVO NO OURIÇO DO MAR ANTÁRTICO *Sterechinus neumayeri* A 0°C (Borges *et al.* 2002)

A fagocitose de leveduras por amebócitos fagocíticos (AF) do ouriço do mar antártico *Sterechinus neumayeri* e sua capacidade germicida foi estudada *in vitro* (1, 2 e 4 horas de incubação) e *in vivo* (1, 2, 4, 8 e 12 horas de incubação) a 0°C. A capacidade fagocítica (CF), índice fagocítico (IF) e capacidade germicida (CG) dos AF foi calculada. O número total de celomócitos variou entre os animais e *In vitro*, foi observado um aumento significativo na CF em todos os períodos e não houve uma diferença significativa da CF em todos os períodos. Ocorreu uma diferença significativa (teste de Wilcoxon) entre a IF e a CF apenas entre 1 e 2 horas de incubação. *In vivo*, não houve diferença significativa entre a CF e o IF, mas ocorreu um aumento significativo na CG nos diferentes períodos. CF e IF foram significativamente maiores *in vitro* que *in vivo* para todos os períodos estudados, e a CG apenas entre 1 e 2 horas. A CF e o IF comparado com os ouriços tropicais (*Lytechinus variegatus*) utilizando-se a mesma metodologia foram menores apesar do mesmo padrão, sugerindo o efeito da baixa temperatura nos fagócitos como um todo.

CICATRIZAÇÃO

CICATRIZAÇÃO A 0°C NO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia coriiceps* (Silva *et al.* 2004, Silva *et al.* 2005)

O objetivo do presente projeto foi caracterizar histologicamente a cicatrização cutânea do peixe antártico *Notothenia coriiceps*, mantido a 0 a 2°C.

Após a anestesia foram realizadas incisões padronizadas para remoção de uma área de 4 cm² na

região dorso lateral anterior. Verificamos um deslizamento do epitélio a partir das bordas da ferida e após 23 dias a lesão se fecha por completo, havendo uma concomitante retração dos bordos da ferida após 10 dias e continuando até o prazo máximo estudado. As escamas não se regeneraram até o prazo máximo estudado. Sob microscopia de luz, verificamos que uma “língua” de tecido epitelial progride a partir das bordas da ferida centripetamente fechando a mesma como um diafragma. Este epitélio está aderido na sua parte mais distal, ficando a ponta da “língua” livre. Verificamos a predominância de neutrófilos até 7 dias sendo substituídos por macrófagos e nos prazos mais longos (acima de 30 dias) já são caracterizados linfócitos e plasmócitos. Sob o epitélio regenerado encontramos intenso infiltrado inflamatório e hemorragia. O epitélio regenerado apresenta-se edemaciado e sob microscopia eletrônica de transmissão o espaço inter celular aumenta sobremaneira até o fechamento completo da lesão. Após 23 dias o epitélio vai retornando sua morfologia original lentamente com um aumento gradativo do número de melanócitos e células de muco e a diminuição do edema intercelular. Sob microscopia eletrônica de varredura (relatório anterior) é possível verificar que o fechamento da ferida somente se dá após 23 dias. Os resultados obtidos são discutidos comparativamente com a literatura disponível e este estudo mostra pela primeira vez a cicatrização do tegumento de um peixe sob temperaturas polares.

DISCUSSÃO

Podemos concluir que os mecanismos de resistência natural à infecção estudados por nosso grupo são essenciais para a vida destes metazoários e estão adaptados ao ambiente polar. Entretanto, quando comparados com animais de clima tropical como o peixe Curimatá (*Prochilodus scrofa*) e o ouriço-do-mar roxo (*Lytechinus variegatus*) verificamos os índices são bem inferiores (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Também fica evidente a superior resposta de fagocitose dos invertebrados comparativamente aos peixes. Isto provavelmente ocorre devido à maior importância da fagocitose nos mecanismos de resistência natural à infecção neste grupo, uma vez que os peixes também apresentam uma resposta específica de anticorpos (O'Neill 1981). Os invertebrados em

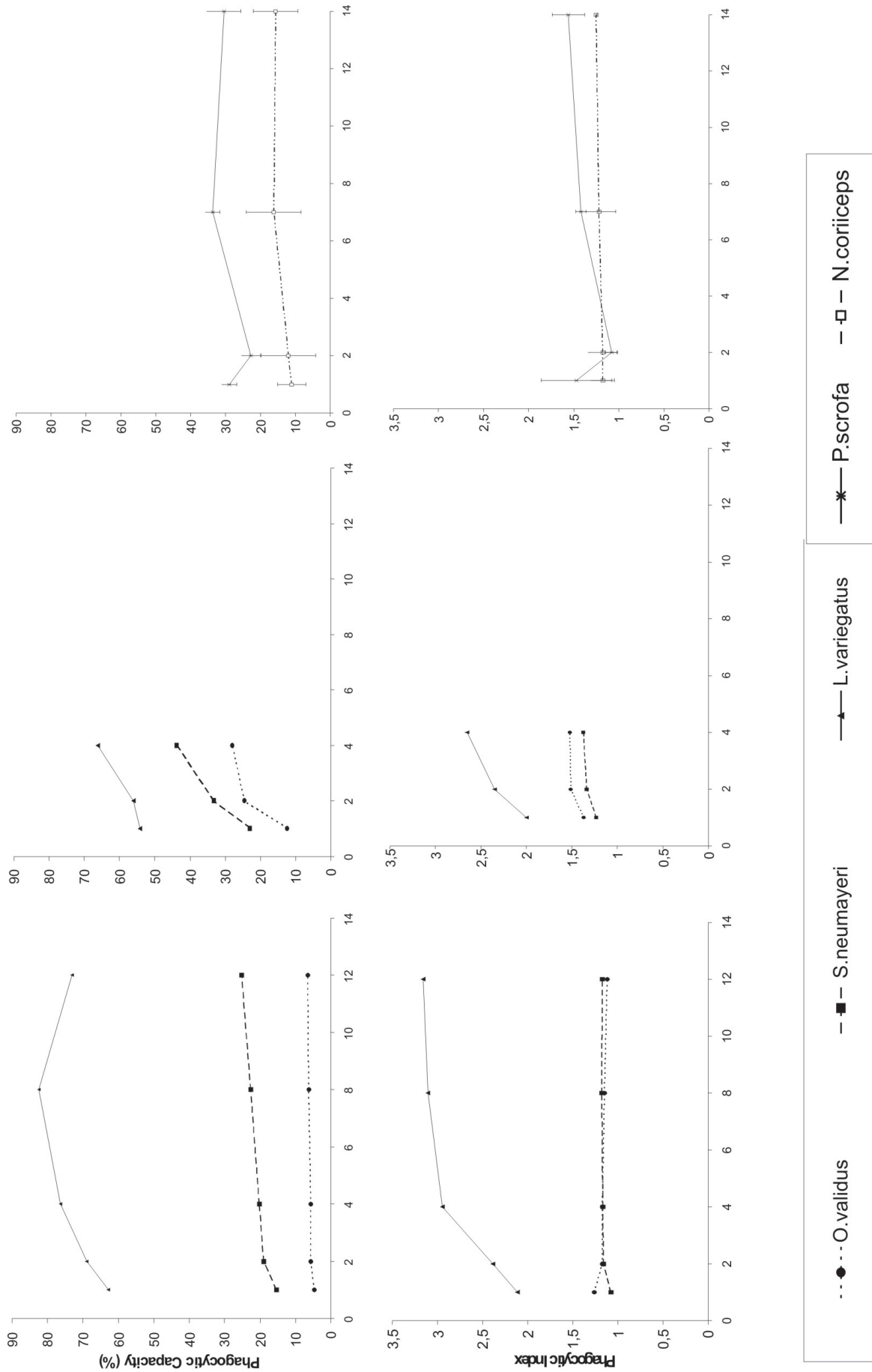


Figura 4. Dados comparativos sobre a capacidade fagocítica e índice fagocítico de peixes antárticos (*Notothenia coriiceps*) e tropicais (*Prochilodus scrofa*), assim como ouriço do mar antártico (*Stereichinus neumayeri*) e tropical (*Lyteichinus variegatus*) e a estrela do mar antártica (*Odontaster validus*) após diferentes prazos de incubação.

geral também apresentam respostas humorais, mas não tão eficientes quanto os sistemas de anticorpos dos vertebrados.

Fica em aberto se, por suas peculiaridades geográficas, os animais estão no ambiente antártico menos sujeitos a ação de bactérias potencialmente patogênicas, ou se ocorreu uma co-evolução dos mecanismos de resistência natural à infecção com os mecanismos de infestação/invasão parasitárias na Antártica. Mais estudos serão necessários para elucidar estas e tantas outras questões sobre os mecanismos de resistência natural a infecção destes animais.

AGRADECIMENTOS: Ao prof. Dr. E. L. Cooper, professor visitante, apoiado pelos fundos da América Latina da UCLA (Latin American Center and the Hewlett foundation), ao PROANTAR (Programa Antártico Brasileiro), a SECIRM e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico), (510581/93-5, 67004-94, 480848/97-1, 490104/99-1, 68.0047/00-0, 48.0262/00-4, 462787/2000-1, 68.0047/00-0, 48.0262/00-4, 473495/04-0) e a FAPESP (1995/2703-9, 2000/03816-1, 00996-4, 2004/14521-3).

REFERÊNCIAS

- BERTHEUSSEN, K. & SELJELID, R. 1978. Echinoid phagocytes *in vitro*. *Experimental Cellular Research*, 111: 401-412.
- BLAZER, S.B. 1991. Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3: 77-86.
- BOOLOOTIAN, R.A. & GIESE, A.C. 1958. Coelomic corpuscles of echinoderms. *Biological Bulletin*, 115: 53-63.
- BORGES, J.C.S.; PORTO-NETO, L.R.; MANGIATERRA, M.B.C.D.; JENSCH-JUNIOR, B.E. & SILVA, J.R.M.C. 2002. Phagocytosis *in vivo* and *in vitro* in the Antarctic Sea Urchin *Sterechinus neumayeri* (Meissner) at 0°C. *Polar Biology*, 25: 891-897.
- CHIA, F. & XING, J. 1996. Echinoderm Coelomocytes. *Zoological Studies*, 35(4): 231-254.
- CLARKE, A. & LEAKEY, R.J. 1996. The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients and the microbial community in a near shore Antarctic marine ecosystem. *Limnological Oceanography*. 41: 1281-1294.
- CLEM, L.W.; SIZEMORE, R.C.; ELLSAESSER, C.F. & MILLER, N.W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses, *Developmental and Comparative Immunology*, 9: 803-909.
- DONALDSON, D.J. & MAHAN, J.T. 1988. Keratinocyte migration and the extracellular matrix. *Journal of Investigative Dermatology*, 90: 623-28.
- EDDS, K.T. 1993. Cell biology of echinoid coelomocytes, I- Diversity and characterisation of cell types. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 173-178.
- ELLIS, A.E. 1977. The leucocytes of fish: a review. *Journal of Fish Biology*, 11: 453-491.
- FINN, J.P. & NIELSEN, N.O. 1971. Inflammatory response in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 3: 463-478.
- FISCHER, W. & HUREAU, J.C. 1985. FAO species identification sheets for fishery purposes. Southern ocean (Fishing areas 48,58 and 88) (CCAMLR Convention Area). Prepared and published with the support of the Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources. Rome, FAO, 2: 233-470.
- GON, O. & HEEMSTRA, P.C. 1990. *Fish of the Southern Ocean*. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, South Africa. 462pp.
- GROUT, B.W.W. & MORRIS, G.J. 1987. *Low Temperatures on Biological Systems*. Singapore, Richard Clay, 501pp.
- HERNADEZ-BLAZQUEZ, F.J. & SILVA, J.R.M.C. 1998. Absorption of lipids and macromolecules in the intestine of antarctic fish *Notothenia neglecta*. *Canadian Journal of Fish Physiology*, 76: 1247-1253.
- HOBBAUS, E. 1978. Studies on phagocytes of regular sea urchins (Echinoidea, Echinodermata) I-The occurrence of iron containing bodies within the nuclei of phagocytes. *Zoological Anzeiger*, 200: 31-40.
- ISAEVA, V.V. & KORENBAUM, E.S. 1990. Defense functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. *Sovietic Journal of Marine Biology*, 15(6): 353-363.
- JOHNSON, P.T. 1969a. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*): I-The normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drop. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13: 25-41.
- JOHNSON, P.T. 1969b. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*): III - *In vitro* reaction to bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13: 42-62.
- MACDONALD, J.A.; MONTGOMERY, J.C. & WELLS, R.M.G. 1987. Comparative Physiology of Antarctic Fishes. *Advances in Marine Biology*, 24: 321-88.
- MANGIATERRA, M.B.C.D. & SILVA, J.R.M.C. 2001. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). *Journal of Invertebrate Biology*, 120(2): 178-184.
- METCHNIKOFF, O. 1921. *Life of Elie Metchnikoff, 1845-1916*. Books for Librarians Press, Freeport, New York, 297pp.
- METCHNIKOFF, E. 1891. *Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at Pasteur Institute in 1891*. Dover, New York [republished in 1991]. 218 pp.
- O'NEILL, J.G. 1981. The immune response of the Antarctic

- teleost *Nothothenia rossi* to the bacteriophage MS2. *British Antarctic Survey Bulletin*, 53:21-27.
- RABINOVITCH, M. 1995. Phagocytosis. *Trends in Cellular Biology*, 5: 85-88
- RATCLIFFE, N.A. & ROWLEY, A.F. 1981. *Invertebrate blood cells*. New York: Cambridge Academic Press. Londres, 323 pp.
- ROWLEY, A.F. & RATCLIFFE, N.A. 1988. *Vertebrate blood cells*. New York: Cambridge University Press. Cambridge, 443 pp.
- SECOMBES, C.J. & FLETCHER, T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 53-71.
- SILVA, J.R.M.C. 2000. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. *Journal of Developmental and Comparative Immunology*, 24: 733-739.
- SILVA, J.R.M.C. COELHO, M.P.D. & NOGUEIRA, M.I. 2000. Induced inflammatory process in *Peripatus acacioi* Marcus et Marcus (Onychophora), *Journal of invertebrate pathology*, 75: 41-46.
- SILVA, J.R.M.C.; COOPER, E.L.; SINHORINI, I.L.; BORGES, J.C.S.; JENSCH-JUNIOR, B.E.; PORTO-NETO, L.R. HERNANDEZ-BLAZQUEZ, B.E. VELLUTINI, B.C.; PRESSINOTTI, L.N. & COSTA-PINTO, B.C. 2005. Microscopical study of experimental wound healing in *Nothothenia coriiceps* at 0°C. *Cell and Tissue Research*, 321(3): 401-410.
- SILVA, J.R.M.C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J. & BARBIERI, R.L. 1998a. Induced inflammatory response in the antarctic fish *Nothothenia neglecta*. *Polar Biology*, 20: 206-212.
- SILVA J.R.M.C., MENDES E.G. & MARIANO M. 1998b. Regeneration on the Amphioxus (*Branchiostoma platae*). *Zoologischer Anzeiger* 237:107-111.
- SILVA, J.R.M.C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L.R. & BORGES, J.C.S. 2001. Comparative study of *in vivo* and *in vitro* phagocytosis including germicide capacity in *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 180-185.
- SILVA, J.R.M.C.; MENDES, E.G. & MARIANO, M. 1995. Wound Repair and Graft Rejection in the Amphioxus (*Branchiostoma platae*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 147-151.
- SILVA, J.R.M.C. & PECK, L. 2000. Induced *in vitro* phagocytosis of the antarctic starfish *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. *Polar Biology*, 23(4): 225-230.
- SILVA, J.R.M.C.; SINHORINI, I.L.; JENSCH-JUNIOR, B.E.; PORTO-NETO, L.R.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; VELLUTINI, B. C. PRESSINOTTI, L. N., PINTO, F.A.C, COOPER, E.L. & BORGES, J.C.S. 2004. Kinetics of induced wound repair at 0°C in the antarctic fish (Cabeçuda) *Nothothenia coriiceps*. *Polar Biology*, 27: 458-464.
- SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L.R. & BORGES, J.C.S. 2002. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage (MØ) of *Nothothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology*, 60: 466-487.
- SILVA, J.R.M.C.; STAINES, N.; PARRA, O.M. & HERNANDEZ-BLAZQUES, F.J. 1999. Experimental studies on the response of the fish *Nothothenia coriiceps*, Richardson, 1844 to parasite *Pseudoterranova decipiens*, Krabbe, 1878 and other irritant stimuli at Antarctic temperatures. *Polar Biology*, 22: 417-424.
- STEIN, M.E. & KESHAV, S. 1992. The versatility of macrophages. *Clinical and Experimental. Allergy*, 22: 19-27.
- SUZUKI, U. & IIDA, T. 1992. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review of Fish Disease*, 2: 149-160.
- TAJIMA, K.; SILVA, J.R.M.C. & LAWRENCE, J.M. 2007. Immunological Response to bacterial disease. Pp.: 167-182. In: Lawrence, J.M. (Org.). Edible sea urchin: Biology and Ecology". Ed. Elsevier, Holanda, 423p.
- TAUBER, A.I. & CHERNYAK, L. 1991. Metchnikoff and the Origins of Immunology, from Metaphor to Theory. Oxford UNIVERSITY PRESS, NEW YORK. 347p.
- TAUBER, A.I. 1994. The immune self: theory or metaphor? *Immunology Today*, 15(3): 134-136.
- ZAPATA, A.G.; VARAS, A. & TORROBA, M. 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology Today*, 13:142-7.

Submetido em 16/08/2007.

Aceito em 01/10/2007.