



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO**

UFRJ

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS**

CINTIA MONTEIRO DE BARROS

**Estudo de componentes do sistema imunológico da
ascídia *Styela plicata*: Uma abordagem
ultraestrutural e bioquímica**

**TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO
PRÉ-REQUISITO AO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS**

**Rio de Janeiro
200**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Estudo de componentes do sistema imunológico da ascídia *Styela plicata*: Uma
abordagem ultraestrutural e bioquímica

Cintia Monteiro de Barros

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

Aprovada em _____ de _____ de 2009 pela Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Silvana Allodi – Orientadora

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão – Orientador

Prof^a. Dr^a. Cláudia dos Santos Mermelstein – Revisora e Suplente

Prof^a. Dr^a. Morgana Lima Castelo Branco - Examinadora

Prof^a. Dr^a Marimélia Porcionatto - Examinadora

Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho – Examinador

Rio de Janeiro
2009

De Barros, Cintia Monteiro

Estudo de componentes do sistema imunológico da ascídia *Styela plicata*: Uma abordagem ultraestrutural e bioquímica / Cintia Monteiro de Barros. Rio de Janeiro: UFRJ / PCM. 2009.

XX, 89p.: il.

Tese de Doutorado

1. Ascídia 2. Hemócitos 3. Heparina 4. Histamina 5. Óxido nítrico

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, PCM.

II. Tese

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

*Aos meus pais por seu amor, dedicação e
colaboração.*

Agradecimentos

À professora Silvana Allodi, por toda a ajuda, ensinamentos, paciência, descontração, apoio, incentivo e tudo mais que uma pessoa com o coração tão grande é capaz de oferecer sem pedir nada em troca. Minha grande admiração por esta grande orientadora.

Ao professor Mauro Pavão por todos os ensinamentos, paciência, gentilezas desde o período da faculdade. Tenho muito a agradecer, pois foi no laboratório do Dr. Mauro que conheci as ascídias e ele sempre me deu grande incentivo e apoio.

Aos professores componentes da banca examinadora por aceitarem participar e por suas contribuições.

À professora Cláudia Mermelstein por ter revisado minha tese com carinho e com muita rapidez, pela disponibilidade, mesmo estando de férias.

Ao professor Leonardo Andrade por ter me ensinado muito sobre microscopia eletrônica desde a época da graduação, por sempre me ajudar nos trabalhos com grande empenho e dedicação.

À professora Ana Martinez pelo grande incentivo, pelas idéias, críticas, conselhos e tudo o mais.

Ao professor Marcelo Narciso pelos momentos de descontração no laboratório, pelo incentivo, pelas críticas construtivas, pelas oportunidades.

À professora Nádia pelo incentivo, pelas oportunidades.

Ao Leandro por ter me ajudado a ministrar aulas para a graduação com sua grande paciência.

Às professoras Mariana, Ana Tovar e Ana Cristina pela grande ajuda no laboratório com idéias, críticas, conhecimentos. Em especial à professora Mariana por ter me ajudado a ministrar as aulas de biologia celular.

Ao professor Mourão pela oportunidade de trabalhar com GAGs, pela ajuda e conhecimentos passados.

Aos amigos do Labteconj por todos esses anos de convívio, Caçambú.

Ao amigo Celso “raio”, estressado, divertido e sem-noção. Mas tudo valeu a pena. Esta grande pessoa com um coração tão grande, por toda a ajuda e paciência nos meus momentos de grande irritação no laboratório e por todos aqueles de descontração.

À amiga Paola que desde a graduação sempre me ajudou, à todos os congressos que fomos juntas, festas e tudo mais, sempre alegre e divertida.

À amiga Eliene, pelas discussões no laboratório, pelas nossas implicâncias com ou sem motivo, com ou sem fundamento, por todo o tempo de graduação e convívio às vezes conturbado, mas sempre feliz e produtivo no laboratório.

A Cristiane e Angélica por todo o carinho, paciência e grande ajuda, todos esses anos no laboratório.

À Priscila, Amanda pelo convívio harmonioso, e sustos no laboratório com o biotério de camundongos.

A Gisele e Daniele por terem me ajudado na tese, sempre pacientes com meu mau humor.

A Monalisa minha grande amiga e que sempre faz falta no laboratório. Esta será uma grande cientista, sempre questionando e com um grande coração.

Ao Clynton por ter me ajudado nos meus experimentos iniciais, com protocolos e paciência, por ter me ajudado na monografia com sua grande e generosa lista de comentários. Sempre organizado.

À Lia pelo convívio e por ter proporcionado momentos de descontração e por ter me dado a oportunidade de ajudá-la com as ostras.

À Paulinha “tchuchuca” sempre disposta a ajudar, com grande humor, e que sempre é companheira ao microscópio eletrônico, obrigada pela paciência.

Às amigas Fernanda, Silmara e Andréia pelos momentos de descontração e carinho, discussões produtivas.

Aos amigos Bruno e Klaus obrigada pela paciência para me ensinar a lidar com o photo shop.

Aos amigos Marcelinho e Pablo pelas sugestões e grandes discussões sobre invertebrados, pelo convívio e momentos de descontração.

Ao Jorge pela ajuda com as técnicas de microscopia, pela paciência e boa-vontade, conseguindo um corante ou me ajudando a emblocar, cortar, etc...

A Silvânia pelas conversas de corredor e animação.

Ao Moisés por ter me dado a oportunidade de trabalhar com os hemócitos das ascídias.

A Michelinha por ter me ajudado nas coletas das ascídias.

A todos do laboratório de ultraestrutura.

Ao professor Mauro Rebelo por me ajudar a desenhar “primers”, e tentar entender um pouco mais de biologia molecular, por abrir as portas do seu laboratório.

Aos meus sobrinhos por toda alegria.

As minhas irmãs pelo incentivo.

Aos meus pais por toda dedicação e incentivo, paciência e amor incondicional.

Ao Ricardo Furtado Simões por me ajudar a pegar água do mar para colocar no aquário, pela ajuda em trazer ascídias para o laboratório, pela paciência em me escutar falando que os experimentos não estão dando certo, pelos momentos de descontração, pelo carinho e grande incentivo, por acreditar em mim mesmo quando nem eu acreditava, por estar disposto a me acompanhar até na China se for preciso, mesmo que isso implique em jogar seus próprios sonhos fora.

Ao meu irmão.

ATIII	Antitrombina III
Bf	Fator B
CTA	<i>Cetyltrimethylammonium</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
cONS	Óxido nítrico sintase constitutiva
CTA-SAX	Cromatografia de troca aniônica forte
eONS	Óxido nítrico sintase endotelial
FPLC	Cromatografia líquida de rápida performance
GAG	Glicosaminoglicano
IRAK	Quinase associada ao receptor da IL-1
IκB	Inibidor kappa B
iONS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MBL	<i>Manose binding lectin</i>
MASP	Lectinas ligantes de manose associadas à serino proteases
MAC	Anticoagulante marinho
MYD88	Fator de diferenciação mielóide 88
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
nONS	Óxido nítrico sintase neuronal
NFκB	Fator de transcrição nuclear κ B
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salino
PVDF	<i>Polyvinilidene fluoride</i>
TRAF	Fator associado ao receptor TNF
PAMP's	Padrão molecular associado ao patógeno
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TPPI	<i>States-time proportion phase incrementation</i>
TCR	Receptor de células T
TNF	Fator de necrose tumoral

Figura 1: Foto dos diferentes tipos de ascídias.....	03
Figura 2: Esquema geral de ascídias solitárias.....	04
Figura 3: Esquema da organização da brânquia em três ordens.....	06
Figura 4: Eletromicrografia de basófilo de mamífero.....	15
Figura 5: A via da síntese do óxido nítrico.....	22
Figura 6: Filogenia e evolução do sistema imunológico.....	27
Figura 7: Elementos do sistema imunológico.....	29
Figura 8: Localização de heparina nos óvulos da ascídia <i>Styela plicata</i>	34
Figura 9: Imunolocalização de heparina e histamina nos grânulos no interior das células teste da ascídia <i>Styela plicata</i>	35
Tabela 1: Classificação, morfologia e função dos hemócitos das ascídias.....	11
Tabela 2: Características imunológicas dos mastócitos e basófilos.....	16

Lista de abreviaturas.....	Xi
Lista de ilustrações e tabelas.....	Xii
Sumário.....	Xiv
Resumo.....	Xix
Abstract.....	XXi
INTRODUÇÃO.....	01
1. As ascídias.....	02
1.1 Túnica.....	05
1.2 Brânquia.....	05
1.3 Hemolinfa.....	07
1.3.1 Plasma.....	07
1.3.2 Células sangüíneas (hemócitos).....	08
2. O sistema imunológico.....	12
2.1 O sistema imunológico dos vertebrados.....	12
2.1.1 Principais células do sistema imunológico dos mamíferos.....	12
2.1.1.1 Os basófilos e os mastócitos.....	14
2.1.1.1.1 Mediadores inflamatórios.....	16
Mediadores pré-formados.....	17
Heparina.....	17
Histamina.....	18
2.1.1.1.2 Os basófilos e mastócitos em invertebrados.....	19
Heparina.....	20
Histamina.....	20
2.1.2 O óxido nítrico (ON).....	20
2.1.2.1 O óxido nítrico e imuno-regulação.....	23
2.1.2.2 O óxido nítrico em invertebrados.....	24
2.2 A evolução do sistema imunológico.....	26

3. O sistema imunológico das ascídias.....	30
3.1 Os hemócitos e suas funções imunológicas.....	32
3.1.1 Células do tipo mastócito nas ascídias.....	33
3.2 O óxido nítrico nas ascídias.....	35
OBJETIVOS.....	38
1. Objetivos gerais.....	39
2. Objetivos específicos.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
1. Coleta de ascídias.....	42
2. Ultraestrutura dos hemócitos.....	42
3. A extração de GAGs.....	43
4. Purificação dos polissacarídeos.....	43
5. Tratamentos enzimático e químico.....	44
6. A análise química do polissacarídeo do plasma.....	44
7. A análise quantitativa do polissacarídeo do plasma.....	45
8. Espectroscopia de RMN.....	45
9. Determinação do peso molecular.....	46
10. Cromatografia de troca iônica forte (CTA-SAX) da heparina após tratamento enzimático.....	46
11. Cromatografia de afinidade da antitrombina III pela heparina dos hemócitos..	47
12. Ensaio de inibição da trombina por antitrombina na presença da heparina dos hemócitos.....	47
13. Atividade de histamina-N-metil-transferase.....	48
14. Imunoeletromicroscopia dos hemócitos.....	48
15. Imunohistoquímica dos hemócitos, brânquia e túnica.....	49

16. Reação NADPH diaforase.....	49
17. Ensaio para detecção de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$	50
18. Teste de viabilidade celular.....	51
19. Ensaio de inflamação <i>in vivo</i> e avaliação da migração celular durante uma reação tipo inflamatória.....	51
20. Análise estatística.....	52
21. <i>Western blotting</i>	52
21.1 Ensaio de determinação da quantidade de proteína.....	52
21.2 <i>Western blotting</i>	52
RESULTADOS	54
1. A hemolinfa das ascídias contém diferentes tipos de hemócitos.....	55
2. A hemolinfa da ascídia <i>Styela plicata</i> contém heparina nos grânulos das células semelhantes a basófilos e uma única galactoglucana no plasma.....	56
3. Os hemócitos da ascídia <i>S.plicata</i> produzem óxido nítrico como mecanismo de defesa.....	58
DISCUSSÃO	59
1. Classificação morfológica dos hemócitos.....	60
2. A caracterização de uma galactoglucana no plasma e de uma heparina no hemócito do tipo granulócito.....	61
3. A hemolinfa da ascídia <i>S.plicata</i> contém heparina e histamina dentro de uma célula semelhante aos basófilos.....	63
4. os hemócitos da ascídia <i>S.plicata</i> produzem óxido nítrico como mecanismo de defesa.....	64
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ANEXO..... 88

As ascídias são invertebrados pertencentes ao filo Chordata, subfilo Urochordata, classe Ascidiacea, e que devido a sua posição filogenética são utilizadas como excelentes modelos para estudos comparativos. A hemolinfa (“sangue”) das ascídias apresenta diversos tipos celulares incluídos no plasma. Essas células desempenham papel fundamental no sistema imunológico deste grupo. Entretanto, existe uma grande confusão a respeito da sua classificação e das suas funções desempenhadas neste sistema. Portanto, no presente trabalho, foi estudada a morfologia das células sangüíneas da ascídia *Styela plicata*, procurando correlacionar a presença de heparina, histamina e óxido nítrico (encontrados em determinados tipos celulares do sistema imunológico dos mamíferos) com a função desempenhada em cada tipo celular no qual estas moléculas foram encontradas. Neste sentido, foram realizadas várias técnicas: imunoeletromicroscopia utilizando-se anticorpos contra óxido nítrico sintase induzível, heparina e histamina; ensaios bioquímicos de caracterização da heparina; dosagem de histamina e sub-produtos do óxido nítrico. Os resultados indicaram que na hemolinfa da ascídia *Styela plicata*, cinco tipos principais de hemócitos foram encontrados: hemoblasto, célula do tipo linfócito, granulócito, célula do tipo mórula e célula pigmentar. Também foi observado que somente o granulócito apresenta morfologia e conteúdos de heparina e histamina semelhantes aos basófilos de mamíferos. Além disso, todos os hemócitos produzem óxido nítrico e o hemócito do tipo linfócito o produz em maiores quantidades, porém, quando os hemócitos são estimulados por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* nenhum aumento na produção de óxido nítrico foi observado, portanto diferente do que ocorre nos macrófagos de mamíferos.

Ascidians are invertebrates that belong to the phylum Chordata, subphylum Urochordata and Class Ascidiacea, which, due to their phylogenetic position, are considered excellent models for comparative studies. The ascidian hemolymph (“blood”) contains different cell types embedded in liquid plasma. These cells play an essential role in the immune system of this group. However, there is some controversy about the classification of the blood cells, and their functions in the immune system are still under investigation. Thus, in this work we studied the morphology of the *Styela plicata* blood cells in order to correlate the presence of heparin, histamine and nitric oxide with their function in each cell where these molecules were found. Therefore, we used techniques such as: immunoelectronmicroscopy with antibodies against inducible nitric oxide, heparin and histamine; biochemical assays for characterizing heparin; dosage of histamine and nitric oxide sub products. Five types of blood cells were recognized and classified as: hemoblast, lymphocyte-like cell, granulocyte, morulla cell and pigment cell. The results also showed that the granulocyte is the only cell type whose morphology and contents of heparin and histamine are similar to the mammalian basophils. Moreover, all the hemocytes studied produce nitric oxide, yet the lymphocyte-like cells produce it more than the others. However, when the hemocytes were stimulated with lipopolisaccharide from *Escherichia coli* no increase was observed in the nitric oxide production, therefore, different from the response of mammalian macrophage.

1. *As ascídias*

As ascídias são invertebrados marinhos sésseis de ampla distribuição geográfica. Elas pertencem à classe Ascidiacea, subfilo Tunicata ou Urochordata do filo Chordata. A maioria dos animais são filtradores, entretanto, existem poucas espécies abissais pertencentes à família Octacnemidae que capturam e se alimentam de pequenos invertebrados (Burighel e Cloney, 1997).

As ascídias foram descobertas por Aristóteles. Sua relação com outros animais foi enigmática e elas foram classificadas como lamelibrânquios. Sua classificação sistemática atual é atribuída aos incisivos estudos de A.O. Kowalewsky em 1866 (Burighel e Cloney, 1997).

As ascídias são os tunicados mais estudados. Elas representam cerca de 3.000 espécies amplamente distribuídas, habitam do litoral à parte das regiões abissais do oceano, incluindo regiões quentes e geladas do equador às regiões polares. São encontradas em águas com luminosidade, porém, elas evitam a luminosidade direta e muitas vivem na obscuridade (Burighel e Cloney, 1997).

As ascídias se encrustam em objetos flutuantes e submersos. Elas são sempre epibióticas com algas, moluscos, esponjas e outras ascídias. Muitas espécies vivem em simbiose com copépodes e algas unicelulares que habitam a superfície das colônias, cavidades, matriz da túnica entre outros (Burighel e Cloney, 1997).

Existem espécies solitárias, coloniais e sociais (Figura 1), porém esta condição tem pouca significância sistemática. Sua dimensão varia de 0,5 mm nos zoóides da ascídia colonial de *Trididemnum miniatum* à 1 m na solitária ascídia *Pyura pachydermatina* (Burighel e Cloney, 1997).

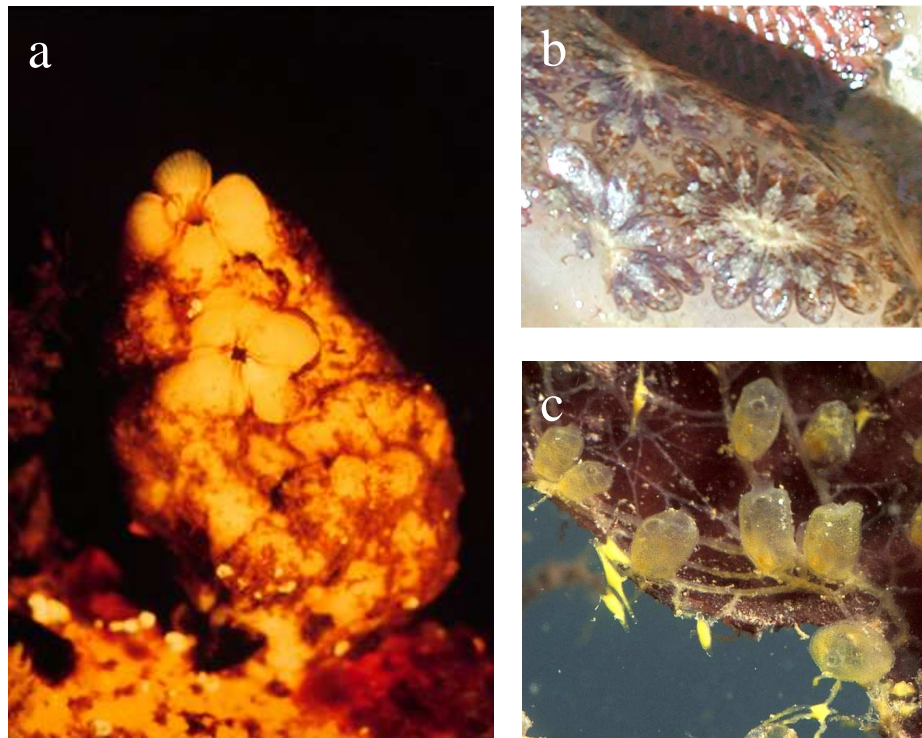


FIGURA 1: FOTOS DOS DIFERENTES TIPOS DE ASCÍDIAS. A) ASCÍDIA SOLITÁRIA *Styela plicata*. B) ASCÍDIA COLONIAL *Botryllus scholoseri*. C) ASCÍDIA SOCIAL *Perophora japonica* (Adaptado de Monniot et al., 1991).

O corpo das ascídias é recoberto por uma camada de células epidérmicas responsáveis pela secreção de uma túnica, fina ou espessa, que envolve todo o corpo do animal. As colônias são homomórficas com diferentes graus de interdependência dos zoóides. Em alguns casos, os zoóides estão completamente embebidos numa túnica comum e a colônia atua como um sistema altamente regulado. Em outros casos, os zoóides são parcialmente cobertos por uma túnica comum e eles se desenvolvem mais ou menos independentes dos outros zoóides, essas são as ascídias sociais (Barnes, 1977; Burighel e Cloney, 1997).

Ao final do estágio larval, um extremo do corpo da ascídia se fixa ao substrato e inicia a metamorfose para o estágio adulto. Na extremidade oposta desenvolvem-se os sifões bucal ou branquial e cloacal ou atrial. Os sifões permitem

a filtração da água do mar através de uma corrente hídrica produzida pelo batimento dos cílios nas fendas branquiais. O material filtrado é encaminhado ao aparelho digestório constituído de esôfago, estômago e intestino, desembocando no átrio onde é excretado (Figura 2) (Thoney, 2004).

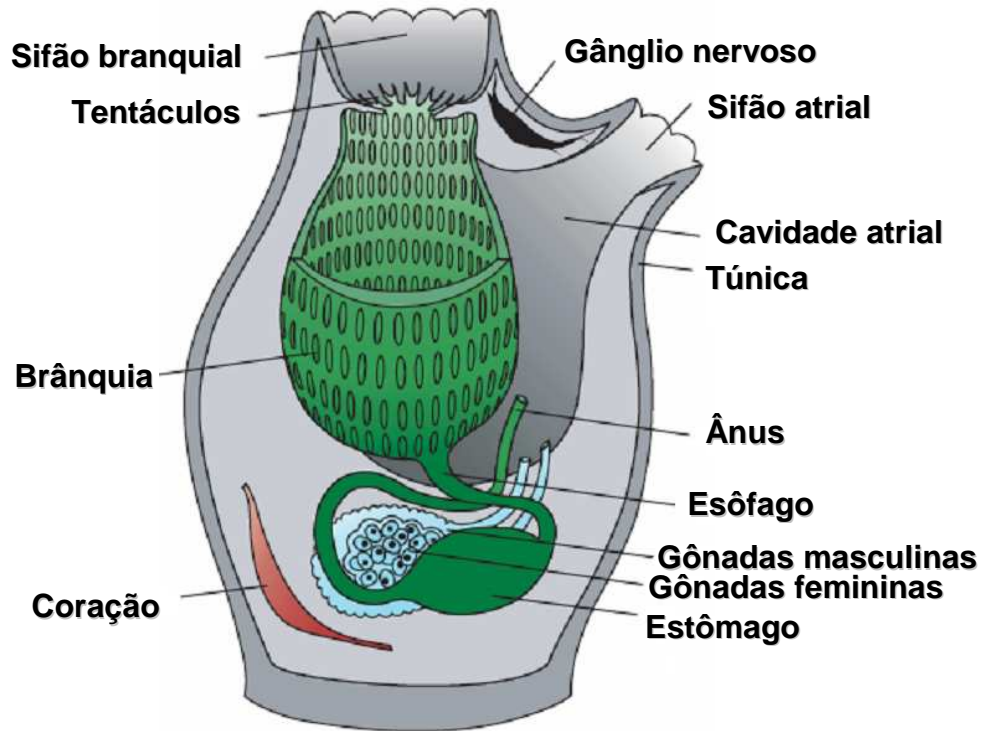


FIGURA 2: ESQUEMA GERAL DE ASCÍDIAS SOLITÁRIAS (Adaptado de Thoney *et al.*, 2004).

Os tunicados têm um sistema sangüíneo-vascular bem desenvolvido, incluindo um coração. Os vasos, geralmente bem definidos, não têm endotélio característico e são canais simples no tecido conjuntivo. Embora o sangue seja freqüentemente pigmentado, nenhum dos pigmentos tem natureza respiratória e os gases são transportados no plasma (Ichikawa, 1966; Barnes, 1977; Shigei *et al.*, 2001).

1.1 Túnica

As túnicas nas espécies do subfilo Tunicata são suficientemente peculiares para distingui-los dos outros invertebrados. A túnica é externa à epiderme e contém células livres, fibras, polissacarídeos sulfatados, entre outros e é principalmente produto da epiderme. A túnica cobre completamente a superfície externa das ascídias solitárias e forma uma matriz comum onde os zoóides das espécies coloniais estão embebidos. Ela possui papel de ancoramento dos adultos ao substrato sólido, e atua principalmente como barreira contra outros organismos, e participa em funções imunológicas, incluindo o reconhecimento do que lhe é próprio e do não próprio. Em algumas espécies ela contém organismos simbióticos e em outras, serve de câmara para abrigar os embriões em desenvolvimento (Burighel e Cloney, 1997).

A túnica é altamente variável na cor, textura, espessura e tipos de inclusões que possui (Goodbody, 1974). Em muitas espécies ela é percorrida por vasos sangüíneos, e geralmente encontra-se grande quantidade de células livres na túnica além da matriz fibrosa. A túnica é dividida em cutícula e matriz: a cutícula é a parte mais externa, fina, acelular e compacta; abaixo encontramos a matriz que contém celulose, polissacarídeos sulfatados, proteínas, entre outros componentes (Burighel e Cloney, 1997).

1.2 Brânquia

A brânquia é um dos maiores órgãos das ascídias e tem sido intensivamente estudada, principalmente em sistemática. A maioria dos autores concorda que a subdivisão das ordens das ascídias (Figura 3) (Aplousobrânquia, Phlebobrânquia e Stolidobrânquia) reflete os três níveis de evolução da brânquia

que pode ser correlacionado com o aumento da complexidade e eficiência do órgão (Fiala-Medioni e Pequignat, 1980).

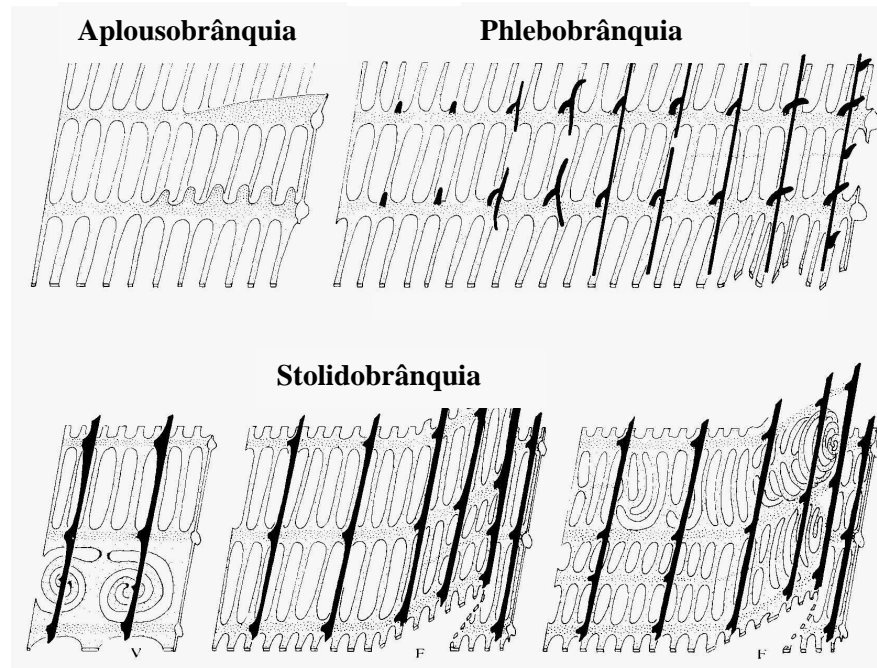


FIGURA 3: ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DA BRÂNQUIA EM TRÊS ORDENS. Aplousobrânquia – brânquia sem dobras e sem vasos sanguíneos; Phlebobrânquia – brânquia sem dobras e com vasos sanguíneos incompletos ou completos; Stolidobrânquia – brânquia com dobras e vasos sanguíneos completos (Adaptado de Monniot *et al.*, 1991).

A brânquia está principalmente envolvida na respiração e captura de alimentos, além de outras funções como: captação de metais pesados (Kalk, 1963), digestão e absorção de material orgânico dissolvido (Fiala-Medione e Pequignat, 1980). Além do mais, ela é responsável pela geração de um movimento hídrico que transporta as fezes, catabólitos e gametas para o exterior do sifão atrial (Buriguel e Cloney, 1997).

Brien, em 1948, fez a revisão da estrutura geral da brânquia e sua organização específica foi descrita por Millar (1953), em *Ciona intestinalis*. Os principais constituintes da brânquia são: as paredes laterais, perfuradas pelos estigmas, o endóstio médio-ventral, a lâmina dorsal e a papila.

A estrutura da parede lateral é formada pela fusão do epitélio da brânquia (de origem endodérmica) com o epitélio atrial (de origem ectodérmica) durante o desenvolvimento. Os compartimentos subepiteliais contêm tecido conjuntivo, músculo, nervos e lacunas sangüíneas (Pestarino, 1988). Todas as ascídias estudadas apresentam um padrão comum de organização do estigma. Elas são constituídas por dois tipos celulares principais: as células estigmatais e as células parietais.

As células estigmatais são laminares e apresentam longos cílios. Elas se encontram sempre agrupadas em sete fileiras de células paralelas formando um tipo de anel inserido numa camada da brânquia e são envolvidas por finas células parietais (Buriguel e Cloney, 1997).

1.3 Hemolinfa

A hemolinfa das ascídias é caracterizada pela presença de células sangüíneas, chamadas hemócitos e pelo plasma. Apesar da hemolinfa das ascídias possuir hemócitos pigmentados, os gases são transportados em solução no plasma (Barnes, 1977).

1.3.1 Plasma

Fienze, em 1911, foi um dos primeiros cientistas a analisar o plasma da ascídia *Phallusia mammilata*. Ele relatou que o plasma desta ascídia é isotônico

com a água do mar e apresenta baixas concentrações de sulfato e de dióxido de carbono (Goodbody, 1974). Algumas outras substâncias já foram relatadas no plasma das ascídias; dentre elas podemos citar: hemaglutininas, serino-proteases, lectinas entre outras.

As ascídias *Styela plicata*, *Phallusia mamillata* e *Ascidia malaca* foram estudadas e descobriu-se que elas possuem atividade de hemaglutinina no plasma. Através de tratamentos físicos e químicos do plasma, evidenciou-se que a hemaglutinina presente no plasma da ascídia *S. plicata* é de natureza polissacarídica, enquanto que nas outras duas espécies é de natureza protéica (Parrinello e Patricolo, 1975).

Mais recentemente, purificou-se e identificou-se uma serino-protease no plasma da ascídia *Halocynthia roretzi*. A purificação foi obtida através de uma cromatografia de troca iônica e outra de afinidade. A sua caracterização foi realizada utilizando-se inibidores de serino-proteases e também foram realizados experimentos de coagulação utilizando-se fibrinogênio bovino e coagulogênio de *Limulus* (Shishikura *et al.*, 1997).

Trabalhos mais recentes têm relatado em ascídias solitárias, a presença de lectinas no plasma. Em *Halocynthia roretzi*, isolou-se uma lectina do tipo ligante de manose (MBL) (Sekine, 2001).

1.3.2 Células sagüíneas (hemócitos)

Os hemócitos participam de diversas funções. Dentre elas podemos destacar o estoque e o transporte de nutrientes, a excreção, regeneração, formação da túnica, reações de defesa e acúmulo de metais pesados. A bioquímica dos hemócitos e a ultraestrutura têm sido estudados, porém, a identificação das células

sangüíneas é sempre equívoca e não há uma terminologia comum para classificá-las (De Leo, 1992).

Os problemas na identificação das células sangüíneas ocorrem porque existe uma grande diversidade de espécies e uma dificuldade de se correlacionar observações dos hemócitos vivos com estudos ultraestruturais (Buriguel e Cloney, 1997). Porém, a análise dos hemócitos de diferentes espécies pôde ser separada em 3 categorias principais: células indiferenciadas, amebócitos e células vacuoladas. Os principais tipos já descritos nas diferentes espécies com suas possíveis funções estão sumarizados na Tabela 1.

Existe uma quantidade considerável de pesquisas sobre a classificação morfológica dos hemócitos. Entretanto, a maioria dos trabalhos utiliza a microscopia de luz, e, de fato, poucos estudos ultraestruturais têm sido realizados para definir com clareza os tipos celulares existentes e, assim, poder correlacionar melhor cada tipo celular com sua função específica (Fuke e Fukumoto, 1993).

Os principais estudos ultraestruturais dos hemócitos foram realizados com as espécies *Halocynthia roretzi* (Fuke e Fukumoto, 1993), *Ciona intestinalis* (De Leo *et al.*, 1981) e com várias espécies do gênero Botryllidae (Hirose *et al.*, 2003), sendo o trabalho de Hirose e colaboradores (2003) com 9 ascídias do gênero Botryllidae, o mais recente. Em *Halocynthia roretzi*, os hemócitos foram classificados em 9 tipos principais: célula vacuolada, amebócitos hialinos, pequenos amebócitos, amebócitos granulares, célula macrogranular, célula globular, célula semelhante aos linfócitos, célula basofílica grande e célula granular. Observou-se que as células vacuoladas estão envolvidas com processos de fagocitose, encapsulação, reconhecimento de moléculas próprias e não-próprias e também desempenham papel na formação da túnica. Os amebócitos granulares agregam-se rapidamente *in*

vitro e podem estar envolvidos na homeostase. Já, a célula granular possui papel importante na formação da túnica. Com exceção da célula globular, quase todos os tipos celulares apresentam movimentos amebóides em proporções diferentes (Fuke e Fukumoto, 1993).

Os hemócitos de *Ciona intestinalis* foram classificados em 4 tipos principais: célula granular, célula morular, fagócito e granulócito. Todos os tipos celulares desta espécie são capazes de se movimentar, encapsular e destruir resíduos. No entanto, somente as células morulares e os granulócitos participam da formação da túnica (De Leo *et al.*, 1981).

No trabalho ultraestrutural mais recentemente publicado, realizado com as espécies do Gênero Botryllidae, os hemócitos foram classificados em 5 tipos principais: hemoblasto, fagócito, granulócito, célula morular e célula pigmentar. A presença de um grande nucléolo e muitos ribossomos nos hemoblastos sugere atividade de síntese. Este tipo celular pode ser considerado pela sua morfologia como uma célula indiferenciada que, provavelmente, dará origem a todas as outras. As células morulares neste gênero são relacionadas com a secreção de peptídeos bactericidas e atividade de fenoloxidase. Especula-se que as células pigmentares tenham função excretora por terem derivados nitrogenados armazenados em seus vacúolos (Hirose *et al.*, 2003).

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO, MORFOLOGIA E FUNÇÃO DOS HEMÓCITOS DAS ASCÍDIAS (Adaptado de Buriguel e Cloney, 1997).

Designação proposta Por Buriguel e Cloney, 1997.	Características principais	Outras designações propostas	Funções
Células indiferenciadas			
Hemoblasto	4-5 μm ; esférica com nucléolo	Hemocitoblasto, célula progenitora	Hemopoiese
Célula do tipo linfócito	Similar, porém sem nucléolo		Reações de rejeição; resposta imune
Amebócito			
Amebócito hialino	5-10 μm ; pseudópodos	Microgranular amebócito; leucócito hialino; amebócito hialino não-vacuolar; célula hemostática	Fagocitose; precursor da célula do tipo mórula; regeneração da túnica; estoque de metais; hemóstase; reações inflamatórias
Amebócito granular	Grânulos redondos evidentes de vários conteúdos e tamanhos	Macrófago; leucócito granular; amebócito macrogranular; célula fagocítica; microgranulócito e célula granular	Fagocitose; estoque de metais; regeneração da túnica; reações inflamatórias
Macrófago	10-15 μm ; forma e tamanho variável; vacúolos sempre com figuras de mielina	Amebócito hialino vacuolar; fagócito; amebócito vacuolado; granulócito vesicular claro	Fagocitose; reações inflamatórias
Células vacuoladas			
Célula " signet-ring "	8-10 μm ; único grande vacúolo	Macrófago; granulócito unilocular	Progenitor da célula do tipo mórula; regeneração da cutícula da túnica; estoque de metal
Célula compartimentar	8-12 μm ; esférica semelhante a uma amora		Estoque de vanádio; progenitor da célula do tipo mórula
Célula do tipo mórula	10-15 μm ; grandes vacúolos contendo um material fortemente elétron- denso	Vanadócito; ferrócito; célula compartimentar; granulócito globular; célula laranja	Estoque de metal; construção e regeneração da túnica; reação de rejeição; encapsulação; hemostase
Célula pigmentar	30-40 μm ;	Granulócito globular	Estoque de catabólitos; pigmentação; proteção UV
Nefrócito	Não em todas as espécies; 15-40 μm ; vacúolo gigante contendo numerosos pequenos grânulos de forma cristalina	Célula pigmentar purínica; célula purínica; granulócito globular	Excreção de nitrogênio

2. O sistema imunológico

2.1 O sistema imunológico dos vertebrados

Nós, da espécie humana, estamos sujeitos a nos deparar com bactérias, vírus e outros patógenos todos os dias. A pele e as mucosas atuam como uma primeira barreira, porém, muitos patógenos ainda penetram no nosso corpo. Entretanto, a maioria das infecções nos indivíduos normais é transitória e provocam pouco ou nenhum dano. Isto se dá devido ao nosso sistema imunológico que combate os agentes infecciosos. Toda resposta imunológica envolve, primeiramente, o reconhecimento do patógeno e, secundariamente, gera uma reação contra para eliminá-lo. Existem dois tipos de resposta imunológica: inata e adaptativa. A resposta adaptativa é altamente específica para um patógeno específico e melhora a cada encontro com o mesmo, enquanto que a resposta imunológica inata não se altera mesmo com repetitivas exposições ao mesmo agente patogênico (Sharon, 2000).

A imunidade às infecções é mediada geralmente, portanto, por dois sistemas imunológicos, inato (ou natural) e o adquirido (ou adaptativo). O sistema imunológico inato é uma forma ancestral e crucial para a primeira linha de defesa e começa a desempenhar seu papel antes do sistema imunológico adaptativo (Du Pasquier e Smith, 2003).

2.1.1 Principais células do sistema imunológico dos mamíferos

Há várias células e mediadores liberados por elas que estão envolvidos na resposta imunológica. Os leucócitos são o principal grupo de células imunológicas dos mamíferos, consistindo de células fagocíticas (monócitos,

macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os linfócitos (linfócitos T e B). Os fagócitos possuem um sistema de reconhecimento não específico e representam a primeira linha de defesa na resposta inata. Por outro lado, os linfócitos reconhecem especificamente patógenos individuais que estão envolvidos na resposta adaptativa. Um número de outras células medeia a inflamação, e o principal propósito é a migração destas para o tecido conjuntivo através de mediadores solúveis que guiam estas células até o sítio da infecção. Estas células incluem mastócitos, basófilos, monócitos, entre outras (Kierszenbaum, 2004).

Os monócitos possuem o núcleo oval ou reniforme e possuem grânulos citoplasmáticos pequenos. Eles circulam no sangue durante 12 a 100 horas e após adentram o tecido conjuntivo onde se diferenciam em macrófagos especializados na fagocitose das bactérias, na apresentação de antígenos e na remoção de restos celulares (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os linfócitos possuem núcleo redondo e seu citoplasma possui poucos grânulos primários, podem viver por poucos dias ou por vários anos. Podem ser subdivididos em linfócitos B e T. Os linfócitos B são produzidos e amadurecem na medula óssea. As células B estimuladas por antígenos se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos. Os linfócitos T são produzidos na medula óssea, mas completam sua maturação no timo (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os neutrófilos são células que possuem o núcleo lobulado e seu citoplasma possui grânulos primários e secundários, constituem cerca de 60 a 70% dos leucócitos circulantes, têm uma vida média de 6 a 7 horas e podem viver até quatro dias no tecido conjuntivo. Após deixar a circulação os neutrófilos eliminam as bactérias opsonizadas ou limitam a extensão de uma reação inflamatória no tecido

conjuntivo. As enzimas contidas nos seus grânulos e os seus receptores específicos permitem a sua função antibacteriana e migratória (Kierszenbaum, 2004).

Como os neutrófilos, os eosinófilos possuem um núcleo bilobulado característico. Seu citoplasma contém grânulos volumosos e refráteis, e constituem de 2 a 4 % dos leucócitos circulantes. Essas células combatem parasitas e participam de processos alérgicos (Kierszenbaum, 2004).

2.1.1.1 Os basófilos e os mastócitos

A primeira descrição dos mastócitos foi feita em 1877 quando Paul Ehrlich observou que algumas células no tecido conjuntivo dos animais continham grânulos que se coravam com cor diferente da do corante utilizado (metacromasia) como o azul de toluidina e alguns outros corantes. Dois anos mais tarde, Ehrlich descobriu células similares no sangue e as chamou de basófilos. A similaridade destes dois tipos celulares está na presença de grânulos citoplasmáticos que têm forte afinidade por corantes básicos e apresentam metacromasia quando por estes corados (Mota, 1995).

Jorpes e colaboradores, em 1946, realizaram um longo trabalho sobre o poder anticoagulante de um material isolado de fígado de cachorros que foi chamado de heparina. Nesses estudos, foi observado que a heparina, quando corada com azul de toluidina, apresentava metacromasia. Dessa forma, foi demonstrada uma correlação direta entre mastócitos, presentes neste tecido específico, e a heparina dele extraída (Mota, 1995).

Mastócitos e basófilos são tipos celulares que se originam do mesmo precursor celular pluripotente. Seu desenvolvimento subsequente é controlado por citocinas distintas. Considerando-se que basófilos e mastócitos foram preservados

ao longo da evolução, provavelmente eles devem desempenhar uma importante função no corpo. Mastócitos são encontrados, preferencialmente, na pele, superfícies mucosas e ao redor dos vasos sanguíneos. Os basófilos, por outro lado, são encontrados no sistema circulatório (Figura 4) (West, 1990; Abraham e Arock, 1998).

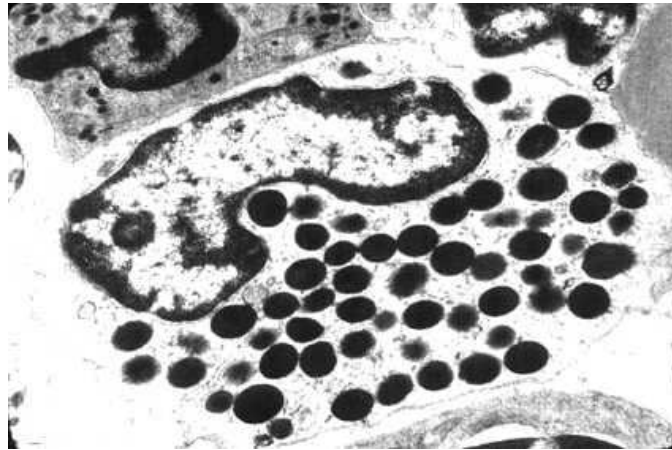


FIGURA 4: ELETROMICROGRAFIA DE BASÓFILO DE MAMÍFERO, mostrando seus grânulos e núcleo. (Kierszenbaum, 2004).

Ambos os tipos celulares possuem receptores de alta afinidade para imunoglobulina IgE e contêm grânulos com histamina e proteoglicano de serglicina. Porém, os mastócitos possuem heparina como glicosaminoglicano (GAG), diferentemente dos basófilos onde o “core” protéico de serglicina é substituído exclusivamente por cadeias de condroitim sulfato (Iozzo, 1999). Entretanto, elas são morfológicamente distintas, têm características diferentes quando coradas e respondem diferentemente a vários estímulos e drogas (Tabela 2).

Além da heparina ou condroitim sulfato e da histamina, os mastócitos e basófilos apresentam diversos tipos de mediadores inflamatórios e podem ser sensibilizados para liberar o conteúdo dos seus grânulos com IgE e as anafilotoxinas

C3a e C5a, entre outros estímulos. O complexo mecanismo envolvido na liberação dos grânulos ainda não é totalmente compreendido.

Tabela 2: CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DOS MASTÓCITOS E BASÓFILOS (Adaptado de Abraham e Arock, 1998)

Propriedades	Mastócitos	Basófilos
Heterogeneidade da população celular	Sim	Não
Distribuição normal	Pele e mucosa epitelial de vários órgãos e tecidos	Circulação e no tecido durante a infecção
Potencial para proliferar no sítio da inflamação	Sim	Não
Período de vida	Meses a anos	Horas
Receptores para várias opsoninas		
CR3 (complemento)	Sim	Sim
FcγR (IgG)	Sim	Sim
FcεRI (IgE)	Sim	Sim
Capacidade de mediar a ligação aos micróbios independente de opsonina	Sim	Sim
Capacidade de fagocitar e matar micróbios	Sim	?
Capacidade de processar e apresentar antígenos dos micróbios as células imunológicas	Sim	Não
Resposta à quimiotaxinas	Sim	Sim
Capacidade de liberar mediadores proinflamatórios	Sim	Sim

2.1.1.1 Mediadores inflamatórios

Após a ativação, um grande número de mediadores é liberado por mastócitos e basófilos no tecido conjuntivo. Uma vasta quantidade deles é

estocada pré-formada em seus grânulos na forma ativa, porém, alguns como as citocinas e mediadores lipídicos são sintetizados no momento da ativação.

Mediadores pré-formados

Heparina

A heparina é um GAG sulfatado, composto por unidades dissacarídicas de ácido hexurônico (ácido α -L-idurônico ou β -D-glucurônico) unido por ligação glicosídica do tipo 1 \rightarrow 4 à α -D-glicosamina. A molécula de heparina, isolada de tecidos altamente vascularizados como intestino e pulmão de bovinos e suínos é composta por uma mistura heterogênea de polímeros com uma cadeia semelhante. A heterogeneidade resulta de variações de sulfatação na D-glicosamina (N-acetilação, N-sulfatação, O-sulfatação no carbono 3 ou/e 6) e no resíduo de ácido hexurônico (O-sulfatação no carbono 2) (Iozzo, 1999).

Em vertebrados, as cadeias de heparina (normalmente 7 cadeias de ~ 100KDa) estão covalentemente ligadas a uma cadeia protéica de <20 KDa, enriquecida por aminoácidos de serina e glicina, formando o proteoglicano chamado "ser-glicina", com ~ 750 KDa (Iozzo, 1999). As cadeias de heparina encontram-se O-ligadas a resíduos de serina na região "ser-gli" da molécula, que é altamente resistente à ação de enzimas proteolíticas, como tripsina, pepsina, protease V8 e outras (Selden *et al.*, 1985). Os proteoglicanos "ser-glicina", ricos em heparina, são encontrados somente em mastócitos, onde possuem função fundamental no empacotamento e regulação de proteases (quinases, triptases e carboxipeptidases A) e outros compostos biologicamente ativos no interior de grânulos secretores (Day *et al.*, 1987; Tasheva *et al.*, 1998). Publicações recentes indicam que a falta de heparina causa um defeito severo no empacotamento e expressão de proteases no

interior dos grânulos de mastócitos de camundongo (Humphries *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado em dois estudos separados com camundongos “knockout” para a enzima N-Deacetilase, responsável pela N-deacetilação da cadeia de heparina durante a sua síntese, e para ser-glicina, que os mastócitos apresentavam defeito na morfologia e no estoque e retenção de mediadores pré-formados (Henningsson *et al.*, 2002; 2003; 2006).

Histamina

A histamina é um dos mediadores da inflamação mais bem estudados em mastócitos e basófilos. Ela é estocada em seus grânulos e é reconhecida como mediador central de doenças alérgicas. Entretanto, mastócitos são as principais células produtoras de histamina, embora outros tipos celulares também a produzam como basófilos, célula gástrica enterocromafim, nervos e células histaminérgicas. Além destes tipos celulares, linfócitos e monócitos podem produzir histamina em mínimas quantidades (Macglashan, 2003). Os principais efeitos fisiológicos são o aumento da permeabilidade vascular, broncocronstricção, contração do músculo liso e aumento da secreção mucosa.

A histamina medeia suas funções através da sua ligação, como se sabe até o momento, a 4 receptores (H1-H4). H1 e H2 são altamente distribuídos, H3 é restrito ao cérebro, enquanto que H4 é encontrado no intestino e tecidos hematopoiéticos. Por causa da expressão dos receptores H em quase todos os tipos celulares, o papel da histamina no nível celular é extremamente complicado (Bachert, 2002).

A histamina é uma amina vasoativa, 2-(4-imidazolil)-etilamina, formada a partir da histidina pela histidina-descarboxilase (Rang e Dale, 1993). Nos

mastócitos e basófilos, a histamina é mantida em grânulos intracelulares formando um complexo com uma proteína ácida e um GAG. A proteína ácida e o GAG constituem a matriz do grânulo na qual a molécula básica de histamina é retida por forças iônicas e da qual pode ser liberada na troca por íons de sódio, quando o grânulo é exposto ao meio extracelular. A razão molar para histamina, heparina e proteína nos mastócitos é de 1:3:6 e o conteúdo de histamina é de aproximadamente 0,1 a 0,2 pmol/mastócito e 0,01 pmol/basófilo (Rang e Dale, 1993).

2.1.1.1.2 Os basófilos e mastócitos em invertebrados

Os basófilos foram descritos em anfíbios, principalmente em algumas espécies de anuros como o *Bufo marinus*, *Rana pipens* e *Rana esculenta*. Foram realizados estudos dos grânulos dessas células sanguíneas e observou-se que, na maioria das espécies analisadas, a morfologia dos grânulos não era semelhante àquela encontrada nos mamíferos, indicando ser uma forma mais primitiva de basófilo (Frank, 1989). Em invertebrados não há nenhum relato na literatura de células com morfologia ou função semelhante aos mastócitos e basófilos de vertebrados (Reite, 1973). Porém, existem relatos dos componentes como heparina e histamina, que são encontrados nos grânulos como componentes pré-formados em invertebrados.

Heparina

Em invertebrados a heparina ocorre em diferentes espécies de moluscos, crustáceos e ascídias. Foi isolada, na espécie de molusco *Katelaysia opima*, uma heparina com alto peso molecular e excelente atividade anticoagulante

(Vijayabaskar *et al.*, 2008). Também já foi relatada a presença de uma heparina em camarões que possui atividade farmacológica semelhante as das heparinas de baixo peso molecular que são extraídas de mamíferos (Nader *et al.*, 2001). Porém, não foi relatada a presença de heparina em células imunológicas desses invertebrados.

Histamina

Em invertebrados marinhos, a histamina foi detectada em algumas espécies de anêmonas como a *Anemonia sulcata* e a *Actinia equina*, provavelmente associada com os tentáculos (Matuszek, 1992). Outras aminas como a serotonina foram identificadas na espécie *Hydra oligactis*. Outros autores têm demonstrado que algumas espécies de ouriço-do-mar possuem histamina nas toxinas produzidas por eles (Castano *et al.*, 1978; Mathias *et al.*, 1960). Em alguns moluscos, a histamina também foi mapeada e verificou-se que, na espécie *Macoma balthica* está localizada majoritariamente nos principais gânglios do sistema nervoso (Karhumen e Panula, 1991). Crustáceos também utilizam histamina como neurotransmissor nos seus fotorreceptores (Stuart, 1999). Assim, a não ser no sistema nervoso e em poucos relatos no sistema imunológico, nos invertebrados marinhos não há muita informação disponível a respeito da presença desta amina.

2.1.2 O óxido nítrico (ON)

O ON é uma pequena e simples molécula, talvez a menor molécula produzida pelos mamíferos, que tem efeitos fascinantes desde a manutenção inicial da vida, através do controle da circulação placentária e, durante toda a vida, como neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no

aprendizado, e como mensageiro molecular com numerosas funções. Dentre estas, podemos destacar sua função na imuno-regulação atuando no combate aos patógenos numa resposta imunológica não específica ou inata (Conte e Ottaviane, 1995; Flora Filho e Zilperstein, 2000).

A evidência inicial de óxidos de nitrogênio no metabolismo veio de experimentos que demonstraram a produção de nitratos em camundongos “germ-free” no início da década de 80 (Green *et al.*, 1981). Em 1985 demonstrou-se que macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos eram capazes de levar a produção de nitritos e nitratos (Stuehr e Marletta, 1985). Na seqüência, evidenciou-se que a L-arginina era o substrato e a L-citrulina era formada como co-produto (Hibbs *et al.*, 1987). Em 1988, Marletta identificou o ON como o produto da reação de oxiredução da L-arginina (Marletta *et al.*, 1988).

Quase simultaneamente, Furchgott investigava um fator vasodilatador associado ao endotélio vascular e poucos anos mais tarde concluiu-se ser o ON o responsável por esta atividade biológica (Ignarro *et al.*, 1987). Durante o final da década de 80 e início de 90, a comunidade científica aprofundou suas pesquisas adicionando importantes conhecimentos sobre o ON como mensageiro e como toxina, atuando em inúmeros processos patológicos (Flora Filho e Zilperstein, 2000).

No sistema circulatório dos mamíferos o ON inibe a proliferação do músculo liso vascular e regula as interações entre os leucócitos e os vasos sanguíneos. Esses achados estabeleceram o ON como um regulador homeostático em vasos, em que a sua ausência ou produção basal reduzida promove várias condições e estados patológicos como: vasoconstricção, elevação da pressão sanguínea e formação de trombos. Em contraste, a produção exacerbada de ON

leva à vasodilatação, hipotensão e disfunção do metabolismo celular (Moncada e Higgs, 2006).

Conhecimentos atuais apontam o ON como um gás de radical livre inorgânico que é sintetizado através da oxidação da L-arginina à L-citrulina mediada pela enzima óxido nítrico sintase (ONS). Ele é um radical altamente instável que rapidamente reage com outras espécies de oxigênio para formar produtos estáveis como nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e alguns radicais altamente tóxicos como o peroxinitrito (OONO^-). Por outro lado, arginases competem pelo mesmo substrato com a ONS. Como resultado, elas produzem L-ornitina, que pode ser descarboxilada pela ornitina descarboxilase (ODC) para produzir poliaminas (Figura 5) (Rivero, 2006).

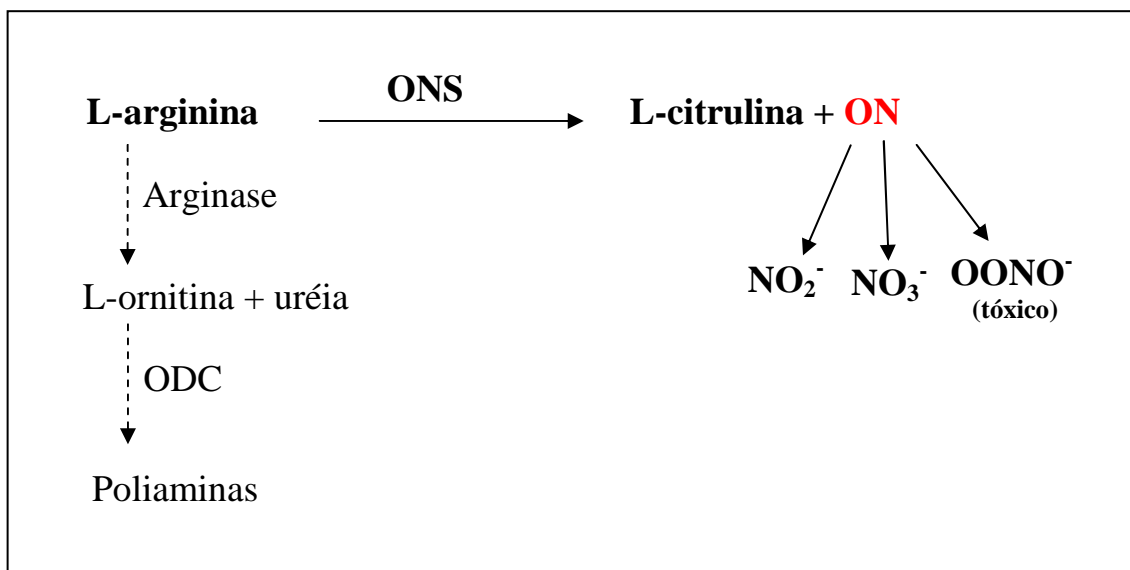


FIGURA 5: A VIA DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO (ON) (Adaptado de Rivero, 2006). O ON é sintetizado a partir da oxidação da L-arginina pela óxido nítrico sintase (ONS).

Em vertebrados, dois tipos principais de óxido nítrico sintase (NOS) têm sido encontrados: a ONS constitutiva (cONS) e a ONS induzível (iONS). A cONS faz parte do metabolismo basal das células e foram descritas duas isoformas: a neuronal (nONS) e a endotelial (eONS). A rápida ativação e inativação da nONS e

eONS através de mudanças nos níveis de cálcio intracelular e a facilidade com que o ON atravessa a membrana celular produz uma resposta muito eficiente que é ideal para a transmissão dos sinais celulares. Em contraste, a isoforma iONS é sintetizada rapidamente por uma variedade de células e tecidos em resposta a citocinas pró-inflamatórias em doenças infecciosas agudas (Knowles e Moncada, 1994; Alderton *et al.*, 2001).

A iONS sintetiza 100-1000 vezes mais ON do que as isoenzimas cONS (nONS e eONS). A alta toxicidade do ON produzido via iONS se deve a quantidade elevada de ON gerada que reage com oxigênio e com intermediários reativos de oxigênio, que têm propriedades enzimáticas e danosas ao ácido desoxirribonucléico (DNA) (Colasanti *et al.*, 2001).

2.1.2.1 O óxido nítrico e imuno-regulação

Além de todas as funções descritas acima, o ON serve como um potente fator imuno-regulatório. Porém, o papel exato do ON na regulação do sistema imunológico ainda permanece duvidoso. Ainda assim, suas principais funções podem ser destacadas como a inibição de genes envolvidos na proliferação e no crescimento celular (Guzik *et al.*, 2003), e a inibição da proliferação de linfócitos T pelo ON produzido por monócitos e células apresentadoras de antígeno (Van der Veen, 2001; Guzik *et al.*, 2003). O ON também pode regular a função de mastócitos, e acredita-se que esta molécula seja inibidora da ativação de mastócitos em processos alérgicos através da inibição da liberação de histamina por estas células (Guzik *et al.*, 2003).

Baixos níveis de ON atuam interagindo diretamente com íons metais carregados positivamente de guanilato ciclase, citocromo P450 e ONS. A ativação

da guanilato ciclase leva à ativação de outros mensageiros que possuem ação final de vaso-relaxamento, aumento da permeabilidade vascular, inibição da proliferação celular, inibição da agregação plaquetária e ação anti-oxidante. Porém, em grandes quantidades, o ON pode matar microorganismos e nitrosilar macromoléculas, causar danos ao DNA, oxidação de LDL, formação de isoprostano e inibição da respiração mitocondrial (Guzik *et al.*, 2003).

O ON também pode ativar outros mensageiros intracelulares levando à ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF κ B) em murinos e, conseqüentemente, aumentar a produção indireta de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6, caso seja produzido em grandes quantidades. Se produzido em pequenas quantidades, ele pode inibir o NF κ B e diminuir o processo inflamatório (Connelly *et al.*, 2003).

Sumarizando, o papel do ON na regulação da resposta imunológica permanece obscuro, principalmente devido ao fato de que é produzido por diversas células que participam em todos os estágios do processo inflamatório. Parece que sua ação na regulação imunológica é dependente de sua concentração, do ambiente celular e das células que sofrem seus efeitos (Guzik *et al.*, 2003; Moncada e Higgs, 2006).

2.1.2.2 O óxido nítrico em invertebrados

Nos últimos anos, houve um evidente aumento de citações implicando a sinalização de ON em vários organismos ao longo da escala filogenética, incluindo notavelmente os invertebrados, tendo-se mostrado uma grande variedade de funções (Palumbo, 2005).

Estudos recentes da presença de ON em invertebrados utilizaram a marcação da NADPH diaforase, uma técnica comumente utilizada para detectar ONS em mamíferos baseada na formação de formazana (Vicent, 1986). Esta técnica tem revelado a presença de ONS no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico de uma variedade de animais marinhos, animais de água doce e moluscos terrestres (Moroz e Gillette, 1996).

Em *Aplysia*, uma marcação positiva da NADPH diaforase é exibida pelos neurônios histaminérgicos (Jacklet, 1995). Em *Sepia* NADPH diaforase é evidenciada no cérebro, numa estrutura análoga ao cerebelo (Chichery e Chichery, 1995). No molusco *Mytilus edulis* o ON está envolvido em mecanismos de defesa (Ottaviani *et al.*, 1993). Este animal elimina as bactérias através de dois processos: fagocitose e formação de agregados de bactérias. O primeiro mecanismo é ativado e, então, quando a fagocitose está ainda ativa, os agregados de bactérias se formam através da ação citotóxica do ON produzido pelos imunócitos (Palumbo, 2005).

É interessante notar que a marcação positiva para NADPH diaforase tem sido reportada também em alguns invertebrados marinhos primitivos como: no sistema neuroendócrino da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis* (Martinez, 1994); e em uma variedade de estruturas larvais no pepino-do-mar *Lytechinus pictus* (Bishop e Brandhorst, 2001).

Os papéis biológicos do ON nos invertebrados marinhos são múltiplos e estão relacionados à alimentação, defesa, estresse ambiental, aprendizagem, metamorfose, simbiose, agregação dos hemócitos e regulação da pressão sanguínea (Palumbo, 2005). Algumas das funções biológicas do ON nos invertebrados marinhos são similares às aquelas encontradas nos mamíferos, o que

nos indica que a sinalização do ON é evolucionária e funcionalmente conservada, estando distribuída ao longo dos vários filos dos invertebrados marinhos (Palumbo, 2005).

Os principais indutores à produção de ON nos invertebrados são o lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, zimosan, extraído de fungos, e os ésteres de forbol. Porém, em alguns invertebrados como o molusco *Mytilus galloprovincialis* o LPS de *E. coli* não estimula o aumento da produção de ON.

2.3 A evolução do sistema imunológico

Durante a evolução, muitas estratégias de defesa foram desenvolvidas para eliminar patógenos e parasitas, e uma grande variedade de mecanismos inatos de defesa é encontrada por todo o reino animal. Em contraste, o acúmulo de evidências sugere que os componentes-chave da imunidade adaptativa, como o rearranjo de genes de receptores e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), são únicos em vertebrados mandibulados (Figura 6)(Kasahara *et al.*,2004).

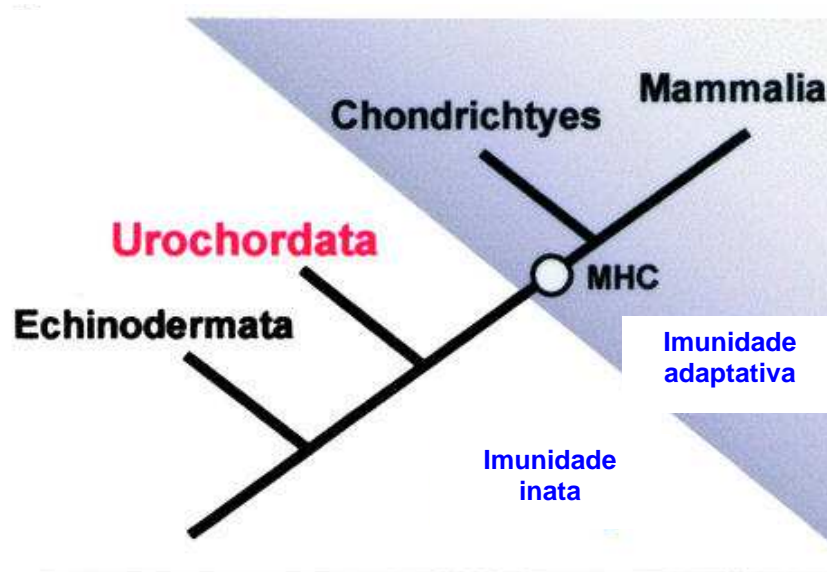


FIGURA 6: FILOGENIA E EVOLUÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO. (Adaptado de Khalturin *et al.*, 2004). O sistema imunológico adaptativo surgiu com os condrictes (peixes mandibulados). Antes deles apenas o sistema imunológico inato está presente.

Existe um grande número de células e mediadores liberados pelas células, que estão envolvidos na resposta imunológica. Os leucócitos são o principal grupo de células imunológicas de vertebrados, que consistem, como foi descrito anteriormente, de células fagocíticas (monócitos, macrófagos e neutrófilos, entre outros) e os linfócitos (T e B). Os fagócitos apresentam um sistema de reconhecimento não-específico e constituem a primeira linha de defesa no sistema imunológico inato. Os linfócitos, por outro lado, reconhecem especificamente patógenos individuais e estão então, envolvidos na resposta imunológica adaptativa (Iwanaga e Lee, 2005).

Durante duas décadas, as estruturas e funções moleculares de vários componentes de defesa, que participam do sistema imunológico inato têm sido estabelecidas com pesquisas em animais como: insetos, límulo, camarões de água doce, moluscos e ascídias. Essas moléculas de defesa incluem fenoloxidasas, fatores de coagulação, lectinas, ON, inibidores de proteases, peptídeos antimicrobianos, receptores Toll, e outros fatores humorais encontrados principalmente na hemolinfa (plasma e hemócitos) (Iwanaga e Lee, 2005).

O sistema imunológico inato foi considerado formalmente como um sistema imunológico não-específico, caracterizado pela fagocitose. Entretanto, a imunidade inata tem considerável especificidade e possui receptores que são capazes de discriminar entre patógenos e componentes próprios. Esses receptores reconhecem padrões moleculares conservados associados aos patógenos (PAMPs),

comuns a um grande grupo de microorganismos, defendendo com sucesso invertebrados e vertebrados contra a infecção (Fujita *et al.*, 2004).

Já, a imunidade adaptativa é caracterizada pela presença de imunoglobulinas (Ig), receptores do linfócito T (TCR) com uma parte variável de receptores gerados por recombinação somática de elementos dispersos no genoma, e por MHC, que estão presentes apenas em vertebrados mandibulados. Assim, os elementos essenciais da resposta imunológica adaptativa estão agrupados num co-envolvimento de unidades Ig-TCR-MHC. Este complexo sistema foi acrescentado aos sistemas inatos herdados dos invertebrados onde somente alguns elementos são conservados, como o sistema complemento, e outros, como a cascata do receptor do tipo Toll, que são ainda requeridos para o início da resposta imunológica adaptativa (Du Pasquier, 2004).

Como e por que este sistema imunológico adaptativo surgiu é uma fascinante questão evolucionária que talvez possa ser revelada com a investigação do sistema imunológico dos cordados que não são vertebrados (Du Pasquier, 2001; 2004). A figura 7 mostra a escala filogenética onde estão representados os componentes do sistema imunológico que já foram caracterizados nos metazoários apresentando uma idéia mais concreta do aumento de complexidade do sistema imunológico dos animais mais primitivos até os mais complexos.

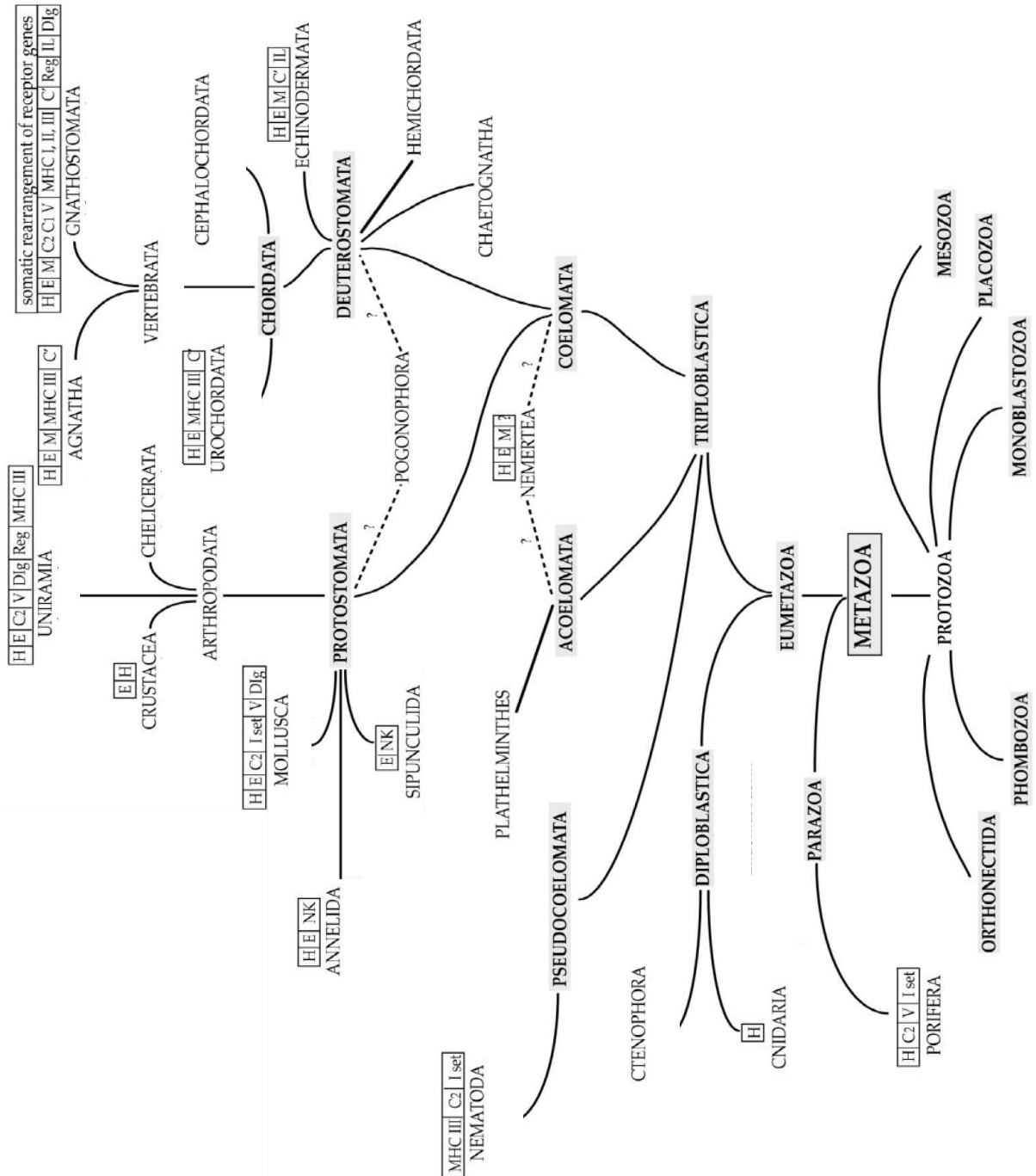


FIGURA 7: ELEMENTOS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO. Adaptado de Du Pasquier, 2001). (C') Complemento. C1, C2, V, I-set, tipos de domínios Ig. (Dig) Membros da superfamília de Ig. (E) Células efetoras de origem mesodérmica. (H) Reação de histocompatibilidade sobre controle genético. (IL) Homólogos ou análogos da interleucina. (M) Memória específica. (MHC I, II, III) Complexo Principal de Histocompatibilidade componentes da classe I, II e III. (NK) Células natural Killer. (Reg) Conservação da via de transdução de sinal dos linfócitos.

3. O sistema imunológico das ascídias

Nos últimos 20 anos, várias pesquisas têm-se concentrado no estudo do sistema imunológico dos invertebrados, com o objetivo de melhor entender o sistema imunológico dos mamíferos. Comentaremos abaixo estes estudos.

Urocordados e vertebrados divergem em aproximadamente 570 milhões de anos na evolução, porém, suas origens morfofilogenéticas sugerem a presença de mecanismos imunológicos comuns. Urocordados são particularmente interessantes devido a sua posição filogenética. Estudos comparativos do sistema imunológico de urocordados e vertebrados podem dar uma luz à evolução do sistema imunológico inato, a origem do sistema imunológico adaptativo e os mecanismos de alo-reconhecimento (Khalturin *et al.*, 2004).

Sendo assim, existem várias razões para se analisar o sistema imunológico dos tunicados. Os tunicados são cruciais para nos ajudar na compreensão de detalhes intrincados do sistema imunológico dos mamíferos. Provavelmente, o complexo sistema imunológico dos humanos não surgiu *de novo*. Ao invés disso, ele evoluiu a partir do sistema imunológico inato presente nos protocordados. Os tunicados são excelentes modelos: eles não são caros para serem obtidos, não-controversos socialmente e têm características únicas. Tunicados, como humanos, pertencem à linha dos protocordados que incluem todos os vertebrados.

Assim, a descoberta de mecanismos imunológicos em tunicados poderia prover uma alternativa ao uso tradicional de mamíferos (camundongos, ratos) emergindo como modelo para se responder questões básicas a respeito da imunidade e de doenças em Urocordados, os ancestrais dos vertebrados (Cooper e Parrinello, 2001).

Para alguns autores é controversa a evolução do sistema imunológico ao longo do Filo. Sendo assim, é necessário que sejam realizadas mais pesquisas com tunicados para a identificação de mecanismos moleculares do sistema imunológico destes animais, o que ajudaria na confirmação de homologias evolucionárias e justificaria a completa extrapolação para o sistema imunológico dos mamíferos (Cooper e Parrinello, 2001).

Várias espécies de ascídias já foram estudadas, e observou-se que seu sistema imunológico está principalmente relacionado com as células presentes na hemolinfa, os hemócitos, e com fatores humorais encontrados no plasma. Também, um número de possíveis genes do sistema complemento foi recentemente identificado em *Ciona intestinalis* (Azumi *et al.*, 2003). Em vertebrados superiores, cerca de 35 proteínas são conhecidas por ter função nas três vias de ativação do sistema complemento, clássica, alternativa e da lectina (Fujita, 2002). E, surpreendentemente, quase os mesmos números de componentes do sistema complemento estão presentes nas ascídias (Nonaka, 2001). Em *H. roretzi*, clones do cDNA do terceiro componente do sistema complemento (C₃), lectinas ligantes de manose associadas com serino proteases (MASP) e fator B (Bf) foram isolados do hepatopâncreas na biblioteca de cDNA (Nonaka e Azumi, 1999).

Além dos genes para o sistema complemento, muitos outros genes envolvidos no sistema imunológico inato de cordados invertebrados, como a *Ciona intestinalis*, têm sido identificados, incluindo três receptores do tipo Toll e os genes envolvidos na transdução de sinal intracelular da resposta imunológica, como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), o receptor associado a quinase IL-1 (IRAK), o fator associado ao receptor TNF (TRAF), o NFκB, e o inibidor kappa B (IκB) (Azumi

et al., 2003). A análise genômica dos genes da ascídia *Ciona intestinalis* revelou a presença do NFkB com domínios altamente conservados (Yagi *et al.*, 2003).

3.1 Os hemócitos e suas funções imunológicas nas ascídias

Os hemócitos podem atuar como mediadores de fagocitose discernindo moléculas próprias e não-próprias, expressando citotoxicidade, encapsulando antígenos, reparando tecidos danificados e induzindo a coagulação, em possíveis respostas imunológicas inatas (Arizza *et al.*, 1995). Já foi descrita a produção de vários peptídeos microbicidas (Cooper e Parrinelo, 2001), lectinas (Sekine *et al.*, 2001), fatores humorais (Fujita *et al.*, 2004), espécies reativas de oxigênio (Cooper e Parrinelo, 2001), ON (Cima *et al.*, 2004), entre outros.

Na *Halocynthia roretzi*, os hemócitos apresentam várias reações imunológicas. Nos seus hemócitos, encontramos a fenoloxidase, o principal componente derivado da hemolinfa que está envolvido na defesa do hospedeiro. Esse componente está contido nos hemócitos e é liberado quando estes são tratados com zimosan ou LPS, mas não com (1→3)-β-D-glicana (Hata *et al.*, 1998; Iwanaga e Lee, 2005).

Com respeito às moléculas de proteínas envolvidas na fagocitose e no reconhecimento de patógenos, o genoma da *Ciona* contém várias integrinas α e β, lectinas do tipo C, proteínas ligadoras de bactérias Gram-negativas e proteínas ligadoras de LPS. Entretanto, ainda não foi reportado nenhum sistema de coagulação nas ascídias (Iwanaga e Lee, 2005).

Em *Ciona intestinalis*, vários tipos de hemócitos já foram descritos e observou-se que somente alguns tipos celulares são capazes de realizar fagocitose (Rowley, 1981). Porém, quase todos os tipos celulares desta espécie são capazes de

migrar da hemolinfa para o local da injúria, indicando que estas células estão envolvidas em mecanismos das respostas imunológicas e inflamatórias (De Leo, 1997; Di Bella e De Leo, 2000). Porém, ainda existem poucos estudos que tentam correlacionar a morfologia dos hemócitos a sua função.

3.1.1 Células do tipo mastócito nas ascídias

Há escassa literatura a respeito dos basófilos nas diferentes espécies de animais ao longo da evolução. Sabe-se que os basófilos ou células granulares, como são também designados, são encontrados em basicamente todos os mamíferos. Porém, em aves, répteis e anfíbios pouquíssimos estudos foram realizados.

Em trabalhos mais recentes do nosso grupo com a ascídia *S. plicata* observou-se a presença de uma célula localizada na membrana perivitelínica dos ovócitos, a célula teste, onde se identificou a presença de heparina, um glicosaminoglicano relatado apenas em mastócitos de mamíferos (Figura 8) (Cavalcante *et al.*, 2000).

Cavalcante e colaboradores observaram que esta heparina presente na ascídia *S. plicata*, apresenta exogenamente atividade anticoagulante e estrutura similar à heparina de mamíferos encontrada nos seus mastócitos. E que, quando a célula teste é estimulada com 48/80, um composto conhecido por estimular a desgranulação de mastócitos e basófilos de mamíferos, a célula teste libera o conteúdo dos seus grânulos, indicando ser suscetível ao mesmo estímulo (Cavalcante *et al.*, 2000).

Posteriormente, Cavalcante e colaboradores detectaram a presença de histamina nos grânulos da célula teste (Figura 9), como ocorre em mastócitos de

mamíferos e, pela primeira vez na literatura correlacionou-se a morfologia das células teste a uma função no sistema imunológico que seria de proteção aos ovócitos, indicando provavelmente que esta célula seria uma célula evolutivamente precursora dos mastócitos de mamíferos (Cavalcante *et al.*, 2002).

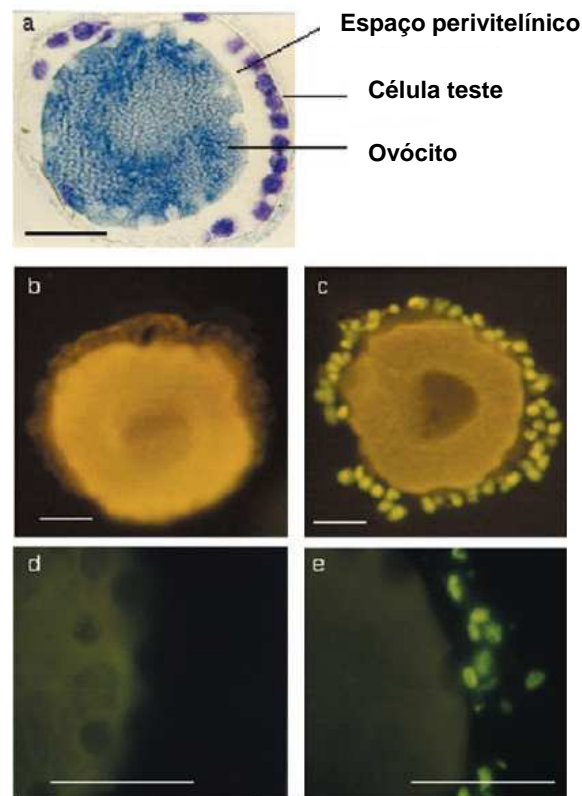


FIGURA 8: LOCALIZAÇÃO DE HEPARINA NOS ÓVULOS DA ASCÍDIA *S. plicata*.

(Adaptado de Cavalcante *et al.*, 2000). **a)** coloração metacromática dos grânulos citoplasmáticos dos óvulos da ascídia com 1,9- azul de metileno. **c e e)** imunofluorescência das células teste com anticorpos anti-heparina. **b e d)** controle sem o anticorpo primário. Barras de escala: 50 μ m.

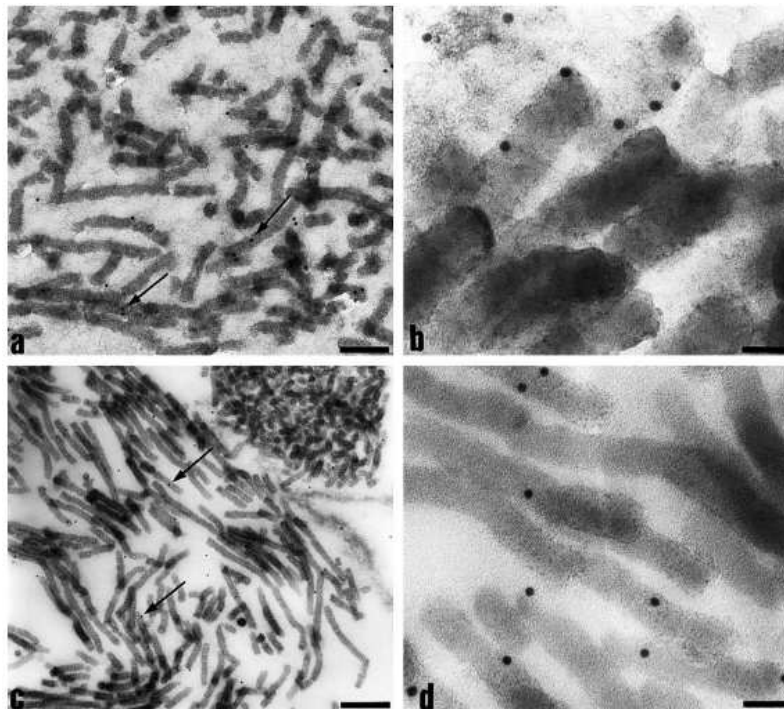


FIGURA 9: IMUNOLOCALIZAÇÃO DE HISTAMINA E HEPARINA NOS GRÂNULOS NO INTERIOR DAS CÉLULAS TESTE DA ASCÍDIA *S. plicata*. (Cavalcante *et al.*, 2002). **a,b)** Imunoeltromicrografia com anticorpo primário anti-heparina **c e d)** Imunoeltromicrografia com anticorpo primário anti-histamina. Barras de escala: a) 150 nm; b) 60 nm; c) 200 nm; d) 70 nm.

3.2 O óxido nítrico nas ascídias

Nas ascídias, o ON também apresenta diversas e importantes funções. Entre essas funções, destacamos seu papel na fertilização, no desenvolvimento e na defesa. No cordado *Ascidella aspersa* o ON não tem papel na fertilização, sugerindo que os cordados apresentam um mecanismo diferente de ativação dos ovócitos em comparação com os ouriços-do-mar (Hyslop *et al.*, 2001). Porém, sabe-se que em *Ciona intestinalis*, o ON ativa os canais de íons nos ovócitos. O tratamento de ovócitos não fertilizados com doadores de ON resulta na geração de uma corrente de fora para dentro, similar à corrente gerada na fertilização pelo espermatozóide (Grumetto *et al.*, 1997).

O ON atua também em estágios posteriores do desenvolvimento: é um inibidor endógeno da metamorfose nas ascídias *Boltenia villosa* e *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Bishop *et al.*, 2001). Em *Ciona intestinalis* Comes e colaboradores investigaram a expressão espacial e temporal da ONS bem como a sua localização e o seu possível papel durante o desenvolvimento e a metamorfose da larva desta ascídia. Eles puderam observar que o ON tem papel como regulador endógeno da regressão da cauda atuando como mediador da ativação de caspases na apoptose (Comes *et al.*, 2007).

Neste mesmo trabalho Comes e colaboradores identificaram a presença de um único gene para ONS que possui homologia com os três genes da mesma enzima nos mamíferos, 53% com a isoforma neuronal, 50% com a isoforma endotelial e 47% com a isoforma induzível (Comes *et al.*, 2007).

Em *Botryllus schlosseri*, um estudo dos aspectos celulares no alo-reconhecimento destas ascídias coloniais, identificou a presença de ON nos estágios iniciais da reação de rejeição. Nestes experimentos, Cima e colaboradores (2004) mostraram um significativo aumento dos íons nitrito, quando os hemócitos eram incubados com plasma sanguíneo heterólogo, indicando uma produção de ON pelos hemócitos, o que pode contribuir para a indução da citotoxicidade gerada pela atividade de fenoxidase nos hemócitos do tipo mórula.

Pelo exposto nota-se que é preciso se caracterizar com detalhes a estrutura dos hemócitos das ascídias, para que se possa correlacionar os seus diferentes tipos com as funções desempenhadas. Foi nesse sentido que esta tese se concentrou tendo já sido publicado um trabalho (De Barros *et al.*, 2007) que relata a presença de uma galactoglucana no plasma e uma célula semelhante aos basófilos de mamíferos que possui heparina e histamina nos seus grânulos, além de uma

caracterização morfológica geral não detalhada dos hemócitos presentes na hemolinfa da ascídia *S. plicata*. E, o outro trabalho que foi submetido pela segunda vez para a revista “Developmental and Comparative Immunology”, as respostas já foram enviadas aos revisores do trabalho que está apresentado na seção de Resultados. Neste trabalho apresentamos uma classificação morfológica dos diferentes tipos de hemócitos presentes na hemolinfa da *S. plicata* com mais detalhes e, também relatamos a presença de ON nos seus hemócitos.

1. **Objetivos gerais**

Neste trabalho, tivemos como objetivo principal realizar um estudo ultraestrutural dos hemócitos na hemolinfa da ascídia *S. plicata*, correlacionando a forma desses hemócitos com a sua função desempenhada no contexto do sistema imunológico deste animal. Para isto, caracterizamos bioquimicamente moléculas presentes nos hemócitos, realizamos ensaios *in vitro* e *in vivo*, utilizamos técnicas de microscopia entre outros. Todas essas técnicas foram utilizadas com o objetivo de melhor entender a relação entre a morfologia e a fisiologia.

O primeiro ponto que foi analisado nesta tese foi a morfologia dos hemócitos, de modo a poder correlacioná-las com as suas funções na ascídia *S. plicata*. Posteriormente, com base nos estudos de Cavalcante e colaboradores (2002), que demonstrou a presença de heparina e histamina co-localizadas nas células teste dos ovócitos da ascídia *S. plicata*, nós nos questionamos se haveria uma célula sangüínea semelhante a esta e aos basófilos de mamíferos na sua circulação.

Dando continuidade ao estudo do sistema imunológico deste animal, nos questionamos a respeito de outra molécula, o ON, que é produzida pelos hemócitos de outros invertebrados, funcionando como principal molécula efetora do sistema imunológico. Em ascídias, há na literatura um relato de que um tipo de hemócito produz ON (Cima *et al.*, 2004). Para isso, realizamos inúmeros ensaios, inclusive ensaios de inflamação *in vivo*, além de utilizar técnicas já conceituadas de detecção como o método da NADPH diaforase.

2. *Objetivos específicos*

Foram os seguintes:

- Caracterizar morfológicamente os tipos de hemócitos utilizando MET;
- Verificar se existe algum hemócito na hemolinfa que apresente morfologia semelhante aos basófilos de mamíferos e às células teste de ascídias;
- Isolar e caracterizar bioquimicamente os polissacarídeos do plasma e dos hemócitos;
- Avaliar a atividade biológica da heparina dos hemócitos;
- Realizar ensaio para medir a atividade enzimática da histamina-N-metil-transferase dos hemócitos;
- Localizar por imunocitoquímica a heparina e a histamina nos hemócitos;
- Identificar quais hemócitos produzem ON através de imunoletromicrografia;
- Identificar a expressão de iONS pelos hemócitos, através de técnicas de imunocitoquímica , NADPH diaforase e *western blotting*;
- Verificar se os hemócitos respondem à produção de ON como os macrófagos de mamíferos, através de estímulos com LPS de *E.coli*;
- Observar se os hemócitos produzem ON em resposta a uma inflamação induzida na sua túnica através da injeção de *E.coli*.

1. Coleta de ascídias

As ascídias foram coletadas na Praia da Urca (RJ) e mantidas em aquário sob aeração à 20° C. A hemolinfa, contendo os hemócitos, foi obtida através de punção na cavidade celômica próxima ao coração com uma seringa, e mantida em tubos contendo uma solução de anticoagulante marinho (MAC-26,3 g de cloreto de sódio, 18 g de glicose, 4,41 g de citrato de trissódico, 2,73 g de ácido cítrico, 3,72g de EDTA em 1000 mL de água destilada, pH 7,0) com igual proporção de hemolinfa. Em seguida, a solução foi centrifugada a 130 x g por 10 min à temperatura ambiente para separação dos hemócitos (Peddie e Smith, 1994). O pellet, contendo os hemócitos, foi fixado para microscopia eletrônica de transmissão ou para microscopia de luz ou ainda, processado para os procedimentos bioquímicos.

2. Ultraestrutura dos hemócitos

Os hemócitos isolados da hemolinfa foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em água do mar, em forno de microondas por 20 seg., pós-fixados em OsO₄ a 1%, desidratados em série crescente de acetona até 100% e infiltrados com resina Epon. Cortes ultrafinos (60 nm) foram obtidos em ultramicrotomo (modelo RMC 6000), depositados em grades de cobre (300 mesh) e contrastados com acetato de uranila (2 %) por 30 minutos e citrato de chumbo (1%) por 5 min. Os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss 900, operado em 80 kV.

3. A extração de GAGs

O pellet contendo os hemócitos foram imersos em acetona por 24h à 4^o C e seco em estufa a 60^oC. O material seco foi ressuscitado em tampão acetato de sódio pH 5,5, contendo 14 g de papaína e incubado à 60^o C durante 24 h. Após extração proteolítica, o sobrenadante foi separado por centrifugação e os polissacarídeos precipitados com etanol 100 % a 4^oC. Este processo foi repetido 2 vezes.

Para a extração dos polissacarídeos do plasma, após a remoção dos hemócitos, o plasma foi dialisado contra água destilada, liofilizado, e o material tratado com papaína como descrito acima. Os polissacarídeos foram precipitados com 2 volumes de etanol 100%.

4. Purificação dos polissacarídeos

Os polissacarídeos obtidos do plasma foram purificados numa coluna de troca iônica, Q-sepharose, acoplada a um sistema de cromatografia líquida de performance rápida (FPLC). A coluna foi equilibrada com 20 mM de tampão Tris/HCl pH 8,1 e os polissacarídeos eluídos com um gradiente linear de 0-2,0 M de NaCl, utilizando-se um fluxo de 2 mL/min. Frações de 1,5 ml foram coletadas e analisadas pela sua reação metacromática, usando-se 1,9-azul de dimetil metileno e eletroforese em gel de agarose (Dietrich e Dietrich,1976;Farndale *et al.*,1986). As frações contendo os polissacarídeos foram agrupadas, dialisadas em água destilada e liofilizadas. Os GAGs obtidos dos hemócitos foram purificados numa coluna de troca iônica Mono Q, equilibrada com 20 mM de tampão Tris/HCl pH 8,1. Os GAGs foram eluídos em gradiente linear de 0-2,0 M de NaCl com um fluxo de 0,5 mL/min.

As frações obtidas da coluna foram dialisadas, liofilizadas e analisadas por eletroforese em gel de agarose (Dietrich e Dietrich, 1976).

5. Tratamentos enzimático e químico

Os polissacarídeos obtidos do plasma e dos hemócitos (50 µg) foram analisados por eletroforese em gel de agarose antes e após o tratamento com 0,001 unidades de heparam sulfato-liase e heparina-liase ou ácido nitroso em 1mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 7,0 contendo 10 mM de acetato de cálcio por 24 h à 37⁰ C e 0,003 unidades de condroitinase AC e condroitinase ABC em tampão acetato de sódio 0,03 M, Tris- HCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, pH 6,0 à 37⁰ C por 24 h. A heparam-sulfato-liase é uma enzima que degrada especificamente heparam sulfato. Ela foi obtida da bactéria *Flavobacterium heparinum* e realiza clivagem eliminativa da ligação α -N-acetil-D-glucosamina. A heparina-liase é uma enzima que atua sobre a heparina e é obtida de *Flavobacterium heparinum*. Seu mecanismo de ação é através da clivagem eliminativa da α -glucosamina ligada à 2-O-sulfo-L-ácido idurônico. A condroitinase AC atua sobre condroitim-sulfato e a condroitinase ABC atua sobre condroitim sulfato e dermatam sulfato. O ácido nitroso realiza um tratamento químico através da clivagem deaminativa da heparina e/ou heparam sulfato como descrito anteriormente por Shively e Conrad (1976). As degradações foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose.

6. Análise química do polissacarídeo do plasma

O total de hexose foi medido pelo método do ácido fenol-sulfúrico de Du Bois (1956). Após a hidrólise ácida feita com ácido trifluoroacético (TFA) 6,0 N a

100^o C por 5 h, o total de sulfato foi determinado pelo método de BaCl₂-gelatina (Saito *et al.*, 1968).

A composição monossacarídica do polissacarídeo sulfatado do plasma foi determinada por cromatografia em papel em solvente butanol:piridina:água (3:2:1, v/v) e ácido isobutírico:amônia (5:3,v/v), após, hidrólise ácida (TFA 98 %, 100^o C por 6 horas) das frações purificadas obtidas pela Q-Sepharose. Os produtos foram revelados no cromatograma através da coloração por nitrato de prata.

7. Análise quantitativa do polissacarídeo do plasma

A composição percentual da cada monossacarídeo que compõe o polissacarídeo do plasma foi estimada através do perfil densitométrico de cada banda revelado pelo cromatograma, utilizando-se o software Molecular Analyst, versão 1.4.1, 1992/1995, Bio- Rad.

8. Espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear)

O espectro ¹H foi realizado utilizando-se um Bruker DRX 600 com um “probe” de ressonância tripla. Cerca de 3 mg do polissacarídeo do plasma purificado foi dissolvido em 0,5 mL de 99,9% de água deuterada. Todos os espectros foram realizados à 60^oC com supressão de deutério de hidrogênio e oxigênio (HOD) por pressurização. O espectro de COSY foi realizado usando estágios de TPPI (states-time proportion phase incrementation) para detecção da quadratura numa dimensão indireta. Todos os deslocamentos químicos foram relativos ao ácido trimetilsililproiônico para ¹H.

9. Determinação de peso molecular

O peso molecular dos polissacarídeos foi estimado através de gel de poliacrilamida 12% (Hilborn *et al.*, 1969). Uma amostra de 50 µg dos polissacarídeos do plasma foi aplicada ao gel e a banda formada foi comparada com padrões de peso molecular de dextram 500, condroitim-6-sulfato, condroitim-4-sulfato e dextram 8.000 para uma análise aproximada do peso molecular por comparação.

10. Cromatografia de troca aniônica forte (CTA-SAX) da heparina após tratamento enzimático

Após exaustiva digestão da heparina (1mg), que foi realizada à temperatura ambiente por 48 h com uma mistura de 2,5 mUI de heparinase I, 2,5 mUI de heparinase II e 2,5 mUI de heparinase III num volume total de 30 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 7,0 contendo de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ 2mM e 2 mg/mL de BSA, as colunas usadas para a cromatografia da heparina digerida foram equipadas com Cromatografia de troca aniônica (CTA), como descrito recentemente (Mourier e Viskov, 2004). O sal eluente foi o sulfonato de metanoamônio, preparado através da neutralização sobre pH 2,5 do ácido sulfônico de metano através de soluções aquosas de amônia. O solvente B do CTA-SAX foi sulfonato de metanoamônia 2M, pH 7,5. O solvente A foi água Milli-Q no pH 7,3 por adição de ácido sulfônico de metano. Um gradiente linear começou com 1% de B até 100% de B em um fluxo de 0,22 mL/minuto por 74 minutos.

11. Cromatografia de afinidade da antitrombina III (ATIII) pela heparina dos hemócitos

A heparina dos hemócitos (1 mg) foi cromatografada numa coluna ATIII-sepharose. A coluna foi preparada através da ligação de 100 mg de ATIII humana (hyphen biomed) com uma Sepharose 4B (Sigma) com brometo de cianogênio. A fração da heparina foi eluída da coluna numa solução de NaCl. A fração de baixa afinidade foi eluída da coluna com NaCl 0,25M em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e dessalinizada em uma Sephadex G10. A fração de alta afinidade foi eluída da coluna com de NaCl 3,0 M em de Tris-HCl 10 mM no mesmo pH e dessalinizada também em Sephadex G10.

12. Ensaio de inibição da trombina por antitrombina na presença da heparina dos hemócitos

A atividade de antitrombina dos picos obtidos da coluna de afinidade foi avaliada por ensaios da atividade amidolítica da trombina usando-se um substrato cromogênico S2228 (Pavão *et al.*,1998). As reações foram realizadas em microcubetas contendo as seguintes concentrações finais dos reagentes: antitrombina 50 nM, trombina 15 nM e 0-10 µg/mL do heparinóide dos hemócitos em 100 µl de Tris-HCl 0,02 M de NaCl 0,15 M e 1,0 mg/mL de polietilenoglicol com pH 7,4 (Tampão TS/PEG). A trombina foi adicionada por último para iniciar a reação. Após 60 seg de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 500 µL de substrato cromogênico S-2238 100 µM em tampão TS/PEG e a absorbância foi lida à 405 nm.

13. Atividade de histamina-N-metil-transferase

Os tecidos da *S. plicata* (intestino, brânquia e hemolinfa) foram homogenizados em tampão fosfato-salino (PBS) (1% V/V) e submetidos à três ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento e, então, submetidos a centrifugação à 1.500 g por 10 min. Os sobrenadantes foram estocados à -20°C até a quantificação do total de histamina e proteína. O conteúdo de proteína total foi quantificado espectrofotometricamente (540 nm) através da técnica do biureto (Fleury e Eberhard, 1951). O conteúdo de histamina foi estimado no sobrenadante pela técnica radioenzimática de Snyder e colaboradores (1966). Os ensaios foram realizados num volume final de 60 μL , consistindo de 10 μL de solução padrão de histamina ou extrato do tecido em 50 μL de uma mistura de histamina-N-metil-transferase, 0,125 μCi de S-adenosil metionato (metil- ^3H) e de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,9. Após as amostras serem incubadas *overnight* à 4°C , a reação enzimática foi parada com a adição de 0,5 mL de de NaOH 1,0 M contendo 10 μL de metil-histamina não marcada. O ^3H complexado à metil-histamina foi então extraído com 3 mL de clorofórmio. Após evaporação da fase orgânica, a radioatividade foi contada num cintilador Beckman LS-100.

14. Imunoeletromicroscopia dos hemócitos

Os hemócitos foram fixados em formaldeído (4 %, preparado a partir de paraformaldeído) em água do mar e/ou carbodiimida (1 %) sob microondas por 20 segundos, desidratados em metanol até 95 % a 4°C , infiltrados em resina LRGold à -20°C e finalmente polimerizados sob luz ultravioleta por 4 dias. Os cortes ultrafinos obtidos (80 nm) foram coletados em grades de níquel (300 mesh), tratados com PBS (0,1 M) e albumina bovina (1 %) por 30 minutos para bloquear os sítios

inespecíficos. Os cortes foram incubados com anticorpos primários (todas da Sigma) contra heparina (monoclonal feito em camundongo) na diluição de 1:50 ou contra-histamina (policlonal feito em coelho) na diluição 1:1.000, ou contra iONS (monoclonal feito em camundongo). Os anticorpos secundários foram anti-camundongo e anti-coelho conjugados a ouro coloidal (10 nm ou 5 nm). Os cortes foram observados ao MET Zeiss 900, operado em 80 kV.

15. Imunohistoquímica dos hemócitos, brânquia e túnica

Pequenos fragmentos da brânquia, túnica e o pellet dos hemócitos foram fixados em paraformaldeído 4% dissolvido em PBS pH 7,3 por 4 h à 4°C, desidratados em concentrações crescentes de etanol e incluídos em parafina. Cortes de 10 µm foram obtidos em micrótomo (Sorvall) e corados com hematoxilina e eosina. Outros cortes foram incubados com anticorpo primário anti-iONS ou anti-NFkB (somente hemócitos e túnica), e anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo para iONS e anticorpo secundário Alexa 488 anti-camundongo para o anti-NFkB. Os cortes foram observados ao microscópio de luz Zeiss Axioplan equipado com uma câmara CCD colorida (MediaCybernetics, modelo Evolution™ MP) com a qual foram obtidas as imagens digitais de 1024 x 1024 pixels de resolução.

16. Reação NADPH diaforase

Para a detecção da enzima ONS nos hemócitos e na brânquia, as células foram obtidas como já descrito acima e colocadas para aderir à lamínulas por 30 min em tampão MAC. Foram então fixadas em paraformoldeído 4%, lavadas em tampão fosfato e colocadas para reagir para NADPH-diaforase utilizando-se o

azul de nitro tetrazolium como cromógeno. Já o tecido da brânquia, dissecado e fixado em paraformaldeído 4% como já descrito para as células sangüíneas, embebido em OCT (Tissue-tek Sakura, Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japão) e as secções (10 µm) foram obtidas em um criostato Leica.

17. Ensaio para detecção de NO_2^- / NO_3^-

Para a análise da produção de NO_2^- / NO_3^- , os subprodutos do ON, a hemolinfa de três animais foi coletada através de punção na cavidade celômica, como já explicado, e misturada em volumes iguais com MAC. Após, a mistura foi centrifugada (130 X g, 4° C, 5 min.). O pellet resultante contendo as células sangüíneas foi ressuspendido em PBS e a densidade celular foi ajustada para 10^6 células/mL. Para se determinar o efeito do LPS de *E.coli* na atividade de ONS nessas células, amostras de 300 µL da suspensão de hemócitos em PBS foram incubadas com 50 µg de LPS por até 360 min, ou incubadas com 10, 50 ou 100 µg de LPS por 1 h. Ao final do período de incubação, as amostras foram imediatamente congeladas à -20° C. Para a análise, o homogenato resultante foi centrifugado (130 X g, 4° C, 10 min.), as proteínas do sobrenadante quantificadas pelo método de Bradford e a razão de NO_2^- / NO_3^- foi determinada utilizando-se um kit de ensaio para óxido nítrico (N° 482702, Calbiochem). O ensaio do kit é baseado no método de Griess modificado que quantifica amostras combinadas de nitrito e nitrato, os quais são utilizados como indicadores da atividade de ONS (Leone *et al.*, 1995). De acordo com o protocolo, o nitrato é enzimaticamente reduzido à nitrito, seguido da degradação do excesso de NADPH diaforase e ocorre então, a adição posterior dos reagentes de Griess. A densidade óptica foi medida utilizando-se um espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda. Os níveis de nitrito foram

medidos em amostras de 60 μ L cada e foram normalizadas as quantidades de proteínas do tecido de acordo com Bradford (1976).

18. Teste de viabilidade celular

Uma alíquota da hemolinfa foi coletada e as incubações com PBS ou LPS realizadas como descrito para o ensaio do $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ em diferentes períodos do tempo e/ou com diferentes concentrações de LPS. Após, a viabilidade celular foi avaliada com azul de tripan utilizando-se o ensaio de exclusão como descrito anteriormente por Ford e Haskin (1988).

19. Ensaio de inflamação in vivo e avaliação da migração celular durante uma reação tipo inflamatória

Uma solução contendo 20 μ L de *E.coli* (10^7 bactérias suspensas em 0,1 mL de PBS) foi injetada na túnica da ascídia *S.plicata* (De Leo *et al.*, 1997; Di Bella *et al.*, 2000). Cinco dias após a injeção, foram isolados fragmentos de 2-5 cm da região onde as bactérias foram injetadas e estes foram fixados como descrito, e observados ao microscópio de luz. Os espécimes de *S.plicata* injetados com PBS foram utilizados como controle. Para confirmar a reação tecidual, as células sanguíneas que migraram para o tecido da túnica foram avaliadas através da quantificação do número de células presentes no campo de observação do microscópio de 3 espécimes injetados com PBS e de 3 espécimes injetados com as bactérias. Cinco campos aleatórios foram selecionados (400 X de aumento) e contados, e o número de células foi avaliado. A presença de iONS e NFkB nas células sanguíneas que migraram para o tecido da túnica foi analisada por imunohistoquímica como descrito anteriormente.

20. Análise estatística

As avaliações estatísticas foram baseadas na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey usando o programa Statistica 6.0 da Statsoft, Inc. (Tulsa, OK, USA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados de significância.

21. Transferência eletroforética

21.1 Ensaio de determinação da quantidade de proteína

Os hemócitos (3×10^6) foram obtidos e colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de PBS ou 100 μ g de LPS de *E.coli* para estimular a produção de iONS por 1 hora. Após, as proteínas foram extraídas utilizando-se o tampão de lise (20 mM de Tris-HCl, 0,1% de SDS, 0,1% de Triton X-100, pH 7,6) sobre estímulo de ondas ultrasônicas por 1 hora. O total de proteína obtido foi precipitado com 10% de ácido tricloroacético e então solubilizado em tampão de Laemmli (1970): 2% SDS, 10% de glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol, 0,62 Tris-HCl, pH 6,8.

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão.

21.2 Western blotting

50 μ g da amostra de proteínas foi utilizada em um gel de SDS-PAGE 5%. As proteínas separadas eletroforeticamente foram transferidas para a membrana de PVDF (polyvinilidene fluoride) utilizando-se o transferidor Bio-Rad (100V/40 min.). Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com o reagente de bloqueio Block Ace (AbD Serotec, Oxford, UK). O anticorpo primário

monoclonal anti-iONS foi utilizado na diluição de 1:4.000, e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase foi um anti-camundongo na diluição de 1:10.000. O iONS foi detectado utilizando-se o sistema de ECL quimiluminescência (Amersham, Buckinghamshire, UK) e um filme (Kodak T-MAT G/RA, Manaus, AM, Brasil). O peso molecular foi estimado utilizando-se padrão de pesos moleculares pré-corados da Bio-Rad Laboratories (Hercules, Calif., USA).

1. **A hemolinfa das ascídias contém diferentes tipos de hemócitos**

Utilizando-se TEM, nós fomos capazes de distinguir 5 tipos de células na hemolinfa da ascídia *S. plicata*: granulócitos, células do tipo linfócito, hemoblastos, células do tipo mórula e células pigmentares. Granulócitos foram os hemócitos mais frequentemente observados. Essas células têm um diâmetro que varia de 4,2 a 5,2 μm , um núcleo excêntrico e pequeno quando comparado ao volume citoplasmático. O citoplasma possui numerosos grânulos de diâmetro que variam de 0,26 a 0,51 μm , com diferentes elétrons-densidades. Alguns destes grânulos apresentam uma interna e regular estrutura elétron-densa similar aos cristalóides encontrados em basófilos e mastócitos de vertebrados.

O tipo celular que lembra morfologicamente um linfócito como descrito por Sawada e colaboradores, e Radford e colaboradores, em ascídias foi também observado em *S. plicata*. Essas células não apresentam nucléolo proeminente nas secções por nós observadas, como descritas por Wright (1981), Sawada e colaboradores (1993) e Radford (1998). Essas células medem de 3,1 a 4,8 μm de diâmetro, e possuem pequenas vesículas e mitocôndrias.

Os hemoblastos apresentaram 6,1 μm de diâmetro e não aparecem frequentemente. Sua principal característica é a presença de um nucléolo proeminente e um citoplasma homogeneamente granular com pouca ou nenhuma organela.

Nós também observamos um tipo celular com um diâmetro variando de 8,8 μm a 16,1 μm : a célula do tipo mórula. Os vacúolos estão quase que completamente preenchidos com um material não-homogêneo compacto e elétron-denso. Dentro dos vacúolos também pode ser observado um material fibrilar.

O último tipo celular identificado, a célula pigmentar, apresenta formato oval ou elíptico com diâmetro de 5,10 a 13,10 μm . Sua típica aparência é por causa do grande número de glóbulos que possui com diâmetros de 0,4 a 5,35 μm que estão parcialmente ou completamente preenchidos com materiais de elétrondensidade variáveis. Quando observado em maior aumento, este material apresenta linhas paralelas elétrondensas juntamente com corpos elétrondensos. O seu citoplasma também apresenta muitas vesículas de diferentes formas e tamanhos.

2. A hemolinfa da ascídia *S. plicata* contém heparina nos grânulos das células semelhantes aos basófilos e uma única galactoglucana no plasma

Neste presente estudo, heparina e um heteropolissacarídeo sulfatado foram purificados da hemolinfa da ascídia *S. plicata*. O heteropolissacarídeo ocorre livre no plasma e é composto de glucose (60%) e galactose (40%) e, altamente sulfatado. A heparina, por outro lado, ocorre nos hemócitos, e, através de cromatografia líquida de alta performance os produtos formados a partir da degradação com enzimas específicas revelaram a composição dissacarídica de $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow4\beta\text{D-GlcN}(\text{SO}_4)$ (39,7%) e $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow4\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ (38,2%). E, pequenas quantidades de dissacarídeos 3-O-sulfatados $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow4\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$ (9,8%) e $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow4\beta\text{-DGlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ (3,8%) também foram detectados. Esses dissacarídeos 3-O-sulfatados foram demonstrados neste trabalho por serem essenciais na ligação da heparina dos hemócitos a antitrombina III. Técnicas de imunoeltronmicroscopia foram utilizadas para demonstrar a presença de heparina e histamina que estavam co-localizadas nos grânulos do hemócito do tipo granulócito. Esses resultados mostraram pela primeira vez que em ascídias, uma galactoglucana sulfatada circula livre no plasma

e que a heparina ocorre como um produto intracelular de uma célula circulante a célula do tipo basófilo.

3. Os hemócitos da ascídia *S. plicata* produzem óxido nítrico como mecanismo de defesa

Um número de outros estudos tem identificado que os hemócitos das ascídias que migram da hemolinfa para os tecidos podem desempenhar inúmeros papéis fisiológicos nos tecidos. Na ascídia colonial *Botryllus schlosseri*, foi reportada a presença de ON em um único tipo de célula: a célula do tipo mórula. Além disso, a análise genômica da ascídia *Ciona intestinalis* confirmou a ocorrência do gene da NOS. Entretanto, em contraste ao genoma dos mamíferos, em que três distintos genes são encontrados, nesta ascídia somente um único gene foi detectado. Então, sabendo, que o ON é expresso nas células com funções anti-inflamatórias, reações imunocitoquímicas foram realizadas para investigar a presença de NOS e verificar se essas células apresentam NOS após estimulação com LPS de *E.coli*. Nossos resultados demonstraram que todos os hemócitos produzem ON, porém o tipo celular do tipo linfócito é o que produz em maior quantidade. Entretanto, em contraste aos macrófagos de mamíferos, após estimulação com LPS a expressão de NOS detectada por imunoeletrtransferência não se alterou bem como a produção de nitrito, mesmo variando-se as concentrações de LPS e/ou os períodos do tempo.

Esta Tese tem como principal objetivo o estudo do sistema imunológico da ascídia *S. plicata* utilizando sua hemolinfa como instrumento de análise.

Nosso objetivo principal foi estabelecer uma correlação entre a morfologia dos hemócitos com sua função imunológica desempenhada. Além disso, através dessas comparações pudemos reunir dados relevantes sobre a morfologia dos hemócitos, constituintes intracelulares, moléculas presentes na hemolinfa e moléculas produzidas na defesa deste animal e, então, realizamos uma comparação com o sistema imunológico dos vertebrados com o intuito de melhor compreender o processo de evolução do sistema imunológico neste filo.

1. Classificação morfológica dos hemócitos

Através de estudos de MET e de acordo com as nossas observações, cinco tipos principais de hemócitos puderam ser identificados: granulócitos, células do tipo linfócito, hemoblastos, células do tipo mórula e células pigmentares. Diferentemente dos nossos resultados Radford e colaboradores, descreveram oito tipos de hemócitos na ascídia *S.plicata*. Sua análise foi baseada em microscopia de campo claro e FACS das células marcadas por imunofluorescência. Em outro estudo na ascídia *Styela clava*, Sawada e colaboradores utilizando microscopia de luz e MET descreveram quatro tipos de hemócitos (Sawada *et al.*, 1993; Radford *et al.*, 1998).

Granulócitos receberam este nome por causa das suas similaridades com os granulócitos encontrados nas ascídias da família *Botrylidae*, especialmente *Botryllus primigenus* (Hirose *et al.*, 2003). Neste tipo celular é que encontramos heparina e histamina co-localizadas em seus grânulos, semelhante aos basófilos de mamíferos.

Hemoblastos tem características típicas de células indiferenciadas, como um nucléolo proeminente, uma alta razão núcleo/citoplasma e poucas organelas. Acredita-se que este tipo celular pode se diferenciar em outros tipos, como músculo liso, célula do tecido conjuntivo, e outros hemócitos (Freeman, 1964; Mukai e Watanabe, 1976; Ermak, 1982; Cloney, 1995).

O outro tipo celular observado por MET foi a célula pigmentar que também já foi descrita em outras ascídias (Radford *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2003). As linhas paralelas elétron-densas observadas no interior dos seus glóbulos citoplasmáticos sugerem autofagia para reciclagem de membrana ou estoque de produtos já metabolizados para a excreção (Burighel e Cloney, 1997).

As células do tipo linfócito estão associadas com a destruição de células em aloenxertos como reportado por Radford e colaboradores (1998) e Peddie e colaboradores (1995). Foi interessante notar que esta célula foi marcada intensamente com o anticorpo para iONS.

2. A caracterização de uma galactoglucana no plasma e de uma heparina no hemócito do tipo granulócito

Neste presente estudo, nós descrevemos a purificação e a caracterização de dois polissacarídeos sulfatados presentes na hemolinfa da ascídia *S. plicata*: uma galactoglucana sulfatada e uma heparina. A hemolinfa das ascídias é composta por diferentes tipos celulares presentes no plasma. Várias proteínas já foram descritas por ocorrer no plasma como inibidores de serino proteases, serino proteases, metaloproteases, fenoxidases, inibidores de tripsina, tripsina, fator de agregação dos hemócitos e diferentes tipos de lectinas. Entretanto, outros polissacarídeos sulfatados só foram descritos na túnica de diferentes espécies de

ascídias incluindo a *S.plicata* (Akita e Hoshi, 1995; Yokosawa *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 1995; Azumi e Yokosawa, 1996; Shishikura *et al.*, 1997; Pearce *et al.*, 2001; Kenjo *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2003). De acordo com nossos conhecimentos a ocorrência de um polissacarídeo livre no plasma é reportado pela primeira vez nesta tese. É interessante notar que a composição de glicídios sulfatados nas ascídias varia de acordo com o tecido e o estágio de desenvolvimento. Por exemplo, na túnica do animal adulto o principal polissacarídeo encontrado é uma galactana sulfatada com alto peso molecular (Pavão, 1996; Mourão e Assreuy, 1995). Já a túnica da larva, por outro lado possui um heteropolissacarídeo composto principalmente de glucose e fucose sulfatada (Pavão, 1996). O polissacarídeo da hemolinfa reportado neste trabalho é uma galactoglucana sulfatada de baixo peso molecular que tem alto conteúdo de sulfato (1,0 mol de sulfato/hexose) quando comparado com os polissacarídeos da túnica do adulto (0,7 mol de sulfato/hexose) e da larva (0,4 mol de sulfato/hexose) (Pavão, 1996).

Glicosaminoglicanos sulfatados não ocorrem na túnica, mas sim nos diferentes órgãos das ascídias (Pavão, 1996). Um dermatam sulfato com baixa sulfatação e uma heparina foram reportados no intestino, coração, brânquia e manto da ascídia *S. plicata*. (Pavão *et al.*, 1998; Gandra *et al.*, 2000). Previamente, nosso grupo relatou a ocorrência de heparina nos grânulos das células teste da ascídia *S.plicata* (Cavalcante *et al.*, 2000). Agora nós reportamos nos hemócitos desta ascídia uma heparina com uma diferente composição formada por aproximadamente quantidades equivalentes de dissacarídeos disulfatados e trisulfatados, além de pequenas quantidades de dissacarídeos tetrasulfatados. Nossos resultados sugerem ainda que as enzimas que sintetizam a heparina na *S.plicata* são diferentemente reguladas nas células teste e nos hemócitos. A análise da ação anticoagulante

dessa heparina dos hemócitos revelou uma atividade de antitrombina 10 vezes maior que a heparina das células teste e similar à observada na heparina dos mamíferos. Esses resultados estão de acordo com a presença de significativas quantidades de resíduos de glucosamina 3-O-sulfatados na heparina dos hemócitos e, que não foram detectados na heparina das células teste (Cavalcante *et al.*, 2000). E, que podem formar uma seqüência de pentassacarídeo com alta afinidade à antitrombina.

3. A hemolinfa da ascídia *S. plicata* contem heparina e histamina dentro de uma célula semelhante aos basófilos

A identificação de um granulócito na hemolinfa da ascídia *S. plicata* que morfológicamente foi relatado aos basófilos de vertebrados foi reportado aqui nesta tese pela primeira vez. Nos grânulos desta célula pudemos identificar uma região central elétron-densa. Grânulos com uma região central elétron-densa estão presentes principalmente em granulócitos de invertebrados superiores como répteis e mamíferos (Zucker-Franklin e Hirsch, 1964; Martinez-Silvestre *et al.*, 2004; 2005), enquanto que grânulos sem uma região central elétron-densa têm sido reportados em granulócitos de vertebrados primitivos como peixes e bufonídeos. Além das semelhanças morfológicas, granulócitos de *S. plicata* também contêm características bioquímicas comuns aos basófilos de vertebrados, como um GAG intracelular, neste caso, heparina e histamina.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que o hemócito do tipo granular pode ser um basófilo primitivo envolvido em mecanismos imunológicos, especialmente quando migra dos vasos sangüíneos para realizar atividades como fagocitose, liberação de peptídeos microbicidas e regeneração dos tecidos.

4. Os hemócitos da ascídia *S. plicata* produzem óxido nítrico como mecanismo de defesa

O ON é um gás produzido pela oxidação da L-arginina à L-citrulina mediada pela enzima óxido nítrico sintase (Bredt e Snyder, 1989). Sabe-se que em mamíferos o ON desempenha diversas funções como a sinalização intracelular, memória, neurotransmissão, vasodilatação e defesa (Moncada *et al.*, 1991). Em invertebrados marinhos, o ON está relacionado a diversas funções, incluindo a defesa (Stefano e Ottaviani, 2002; Tafalla *et al.*, 2003; Fiori *et al.*, 2004; Cima *et al.*, 2004; Palumbo, 2005). Devido ao número de células do tipo linfócito aumentarem durante a resposta imunológica induzida e devido a essas células estarem envolvidas nas reações citotóxicas inatas na *S.plicata* (Raftos *et al.*, 1987; Radford *et al.*, 1998), nós realizamos uma imunoeletromicroscopia utilizando anticorpos anti-iONS. Esta reação foi positiva para as células do tipo linfócito e, pela primeira vez, nós demonstramos que este tipo de célula nesta ascídia reage com estes anticorpos indicando que o ON pode ser um produto funcional destas células.

As células do tipo mórula são consideradas por alguns autores como células citotóxicas ou células relacionadas com as reações de alorreconhecimento entre ascídias coloniais (Hirose *et al.*, 1997; Shirae *et al.*, 2002), sendo capazes de ativar o sistema da fenoloxidase (Cammarata *et al.*, 1997). Entretanto, em *Botryllus schlosseri* foi identificada uma produção de ON por essas células quando estas eram estimuladas por citocinas. Além disso, nossos resultados demonstraram que as células do tipo mórula também são marcadas com anticorpos anti-iONS, porém menos que a marcação observada para as células do tipo linfócito.

Em nossos experimentos utilizamos LPS para induzir uma resposta imunológica que não apresentou significativo efeito no aumento da produção de ON, em contraste aos resultados obtidos por Cima e colaboradores, com soro heterólogo nas ascídias *Botryllus schlosseri* (Cima *et al.*, 2004). Entretanto, a injeção de LPS não afetou a produção de ON, em contraste aos macrófagos de mamíferos, este fato poderia ser explicado pela possibilidade de o LPS não ser o melhor estímulo para se aumentar os níveis de ON, como visto no molusco *Mytilus galloprovincialis* (Knowles e Moncada, 1997; Novas *et al.*, 2004; Arumugam *et al.*, 2000). Nós também não podemos excluir a possibilidade de que em *S.plicata* como em *Ciona intestinalis* somente um único gene para ONS foi encontrado em seu genoma (Comes *et al.*, 2007). Então, o fato da *S.plicata* não aumentar sua produção de ON poderia ser indicativo de que ela apresenta uma única isoforma constitutiva de ONS. Alternativamente a isso, os níveis do controle poderiam ser similares aos dos estimulados por LPS devido ao fato de que essas ascídias foram coletadas na Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, que é uma região eutrofizada, então, esses hemócitos poderiam já estar naturalmente estimulados por *E.coli* presente nas águas dessa região.

O ON pode modular a liberação de uma grande variedade de mediadores a partir de células que participam da resposta imunológica. Por exemplo, o ON pode modular o fluxo sanguíneo, a adesão dos leucócitos a parede do endotélio vascular e a atividade de numerosas enzimas (Wallace, 2005). Entretanto, nenhum aumento nos níveis de ON foi detectado após a injeção de *E.coli* na túnica da ascídia *S. plicata*, nós observamos que muitas células migraram para a túnica iniciando uma resposta inflamatória. E, que essas células que migraram para a túnica produzem ON. Este gás poderia ter tido função de atrair mais células que,

então, poderiam liberar seus mediadores inflamatórios neste microambiente. Entretanto, visto que nenhum aumento nos níveis de ON foi detectado após a injeção de *E.coli*, nós nos perguntamos se algum outro mecanismo seria alvo após o estímulo com LPS. Em mamíferos, a ativação do NFkB está envolvida em muitas vias relacionadas com a imunidade inata como: inflamação, migração celular e reparo. Por outro lado, no invertebrado *Limulus polyphemus* o NFkB está envolvido com o reconhecimento de patógenos, atividade bactericida e possível via de sinalização do iONS (Wang *et al.*, 2006). É interessante notar que nossos resultados sugerem uma ativação do NFkB que possivelmente seria responsável por um sinal para a migração dos hemócitos. Entretanto, nós não pudemos demonstrar o estímulo da produção de ON pelo NFkB.

Em conclusão, podemos observar que todos os hemócitos produzem ON, porém apenas o hemócito do tipo linfócito o produz em maiores quantidades. Também notamos que a geração de ON não é estimulada por LPS de *E.coli* como indicaram os ensaios de dosagem de nitrito, confirmados pela sua expressão no ensaio de *western blotting*. Outro mecanismo de resposta imunológica deve estar presente quando injetamos LPS de *E.coli*, visto que o NFkB está ativo e que várias células migraram para o local em resposta ao estímulo.

Fundamentados nos resultados apresentados nesta tese, pudemos chegar às seguintes conclusões:

1. A classificação morfológica por MET pode nos revelar a presença de 5 tipos principais de hemócitos na hemolinfa da ascídia *S.plicata*: hemoblastos, granulócitos, célula do tipo linfócito, célula do tipo mórula e células pigmentares;
2. Na hemolinfa desta ascídia descrevemos pela primeira vez a presença de uma galactoglucana livre no plasma;
3. A galactoglucana do plasma apresenta alto teor de sulfato (1,0 mol de sulfato/mol de hexose);
4. Na hemolinfa desta ascídia descrevemos a presença de uma heparina com diferente composição daquela descrita nos demais órgãos desta ascídia;
5. A análise dissacarídica desta heparina revelou que ela possui dissacarídeos dissulfatados $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4) - \text{GlcN}(\text{SO}_4)$ e trissulfatados $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4) - \text{GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$, além de pequenas quantidades de dissacarídeos tri e tetrassulfatados contendo glucosamina 3-O-sulfatadas que possibilitam a ligação desta molécula com a ATIII;
6. A heparina aqui caracterizada apresenta elevada atividade de ATIII (anticoagulante) semelhante à da heparina extraída de tecidos de mamíferos;
7. Os órgãos como brânquia, intestino e hemolinfa produzem quantidades consideráveis de histamina;
8. A heparina e a histamina identificadas estão co-localizadas nos grânulos dos hemócito do tipo granular;

9. O hemócito do tipo granular apresenta morfologia semelhante à dos basófilos de mamíferos;
10. Os hemócitos da ascídia *S.plicata* produzem ON;
11. O hemócito que mais se destacou na produção de ON foi o hemócito do tipo linfócito;
12. A produção de ON não aumenta em resposta ao LPS de *E.coli*, como demonstrado através de dosagem de nitrito e *western blotting*;
13. As células da hemolinfa migram e aumentam de número em resposta à LPS de *E.coli* produzindo uma resposta inflamatória similar à descrita nos mamíferos;
14. O NF κ B é ativado durante resposta inflamatória com LPS de *E.coli*.

- ABRAHAM, S.N.; AROCK, M. 1998. Mast cells and basophils in innate immunity. **Sem. Immunol.**, **10**: 373-381.
- AKITA, N.; HOSHI, M. 1995. Hemocytes release phenoloxidase upon contact reaction, an allogeneic interaction, in the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Cell Struct. Funct.** **20**: 81-87.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, **357**: 593-615.
- ARIZZA, V.; CAMMARATA, M.; TOMASINO, M.C.; PARRINELLO, N. 1995. Phenoloxidase characterization in vacuolar hemocytes from the solitary ascidian *Styela plicata*. **J. Invert. Pathol.**, **66**: 297-302.
- ARUMUGAM, M.; ROMESTAND, B.; TORREILLES, J.; ROCH, P. 2000. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. **Eur. J. Cell. Biol.**, **79**: 513-519.
- AZUMI, K.; YOKOSAWA, H. 1996. Characterization of novel metallo-proteases released from ascidian hemocytes by treatment with calcium ionophore. **Zool. Sci.**, **13**: 365-370.
- AZUMI, K.; SANTIS, R.; TOMASO, A.; RIGOUTSOS, I.; YOSHISAKI, F.; PINTO, M.R.; MARINO, R.; SHIDA, K.; IKEDA, M.; ARAI, M.; INOUE, Y.; SHIMIZU, T.; SATOH, N.; ROKHSAR, D.S.; PASQUIER, L.D.; KASARARA, M.; SATAKE, M.; NONAKA, M. 2003. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for godot". **Immunogenetics**, **55**: 570-581.

- BACHERT, C. 2002. The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. **Allergy**, **57**: 287-961.
- BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 3^a ed. México: Interamericana, 1977. p. 855-869.
- BISHOP, C.D.; BRANDHORST, B.P. 2001. NO/cGMP signaling and HSP90 activity repress metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. **Biol. Bull.**, **201**: 394-404.
- BISHOP, C.D.; BATES, W.R.; BRANDHORST, B.P. 2001. Regulation of metamorphosis in ascidians involves NO/cGMP signaling and HSP90. **J. Exp. Zool.**, **289**: 374-384.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254.
- BRIEN, P. Embranchement des tunicers. In: **Traite de Zoologie**. In: GRASSE, P.P. Vol. 11, Paris: Masson et Cie, 1948. Pp 554-930.
- BURIGUEL, P.; CLONEY, R. A. Urochordata: Ascidiacea. 2^a ed. In: HARRISON, F.W.; RUPERT, E.E. **Microscopy anatomy of invertebrates**. Vol. 15, New York: Willey-Liss, 1997. p. 221-347.
- CAMMARATA, M.; ARIZZA, V.; CANDORE, G.; CARUSO, C.; PARRINELLO, N. 1997. Phenoloxidase-dependent cytotoxic mechanism in ascidian *Styela plicata* hemocyte against erythrocytes and K 562 tumour cells. **Eur. J. Cell. Biol.**, **74**: 302-307.
- CASTANO, L.; ROSSI, S.P. 1978. Cytochemical, ultrastructural and fluorescence study of the nervous net of *Hydra* sp. **J. Submicrosc. Cytol.**, **10**: 381-395.

- CAVALCANTE, M.C.; ALLODI, S.; VALENTE, A.P.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; MOURÃO, P.A.; PAVÃO, M.S. 2000. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (tunicate) is restricted to cell layers facing the outside environment. An ancient role in defense? **J. Biol. Chem.**, **275**: 36189-36196.
- CAVALCANTE, M.C.; DE ANDRADE, L.R.; DU BOCAGE, SANTOS-PINTO, C.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; ALLODI, S.; PAVAO, M.S. 2002. Colocalization of heparin and histamine in the intracellular granules of test cells from the invertebrate *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). **J. Struct. Biol.**, **137**: 313-21.
- CHICHERY, R.; CHICHERY, M.P. 1995. NADPH-diaphorase in a cephalopod brain (*Sepia*): presence in an analogue of the cerebellum. **Neuroreport.**, **5**: 1273-1276.
- CIMA, F.; SABBADIN, A.; BALLARIN, L. 2004 Cellular aspects of allorecognition in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. **Dev. Comp. Immunol.**, **28**: 881-889.
- CLONEY, R.A. 1995. Origin and differentiation of the inner follicular cells during oogenesis in *Molgula pacifica* (Urochordata), an ascidian without test cells. **Acta Zool.**, **76**: 89-104.
- COLASANTI, M.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P.; GRADONI, L. 2001. Cysteine protease as a target for nitric oxide in parasitic organisms. **Trends Parasitol.**, **17**: 575.
- COMES, S.; LOCASCIO, A.; SILVESTRE, F.; D'ISCHIA, M.; RUSSO, G.L.; TOSTI, E.; BRANNO, M.; PALUMBO, A. 2007. Regulatory roles of nitric oxide during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis*. **Dev. Biol.**, **306**: 772-784.

- CONNELLY, L.; JACOBS, A.T.; PALACIO-CALLENDER, M.; MONCADA, S.; HOBBS, J. 2003. Macrophage Endothelial Nitric-oxide Synthase Autoregulates Cellular Activation and Pro-inflammatory Protein Expression. **J. Biol. Chem.**, **278**: 26480-26487.
- CONTE, A.; OTTAVIANI, E. 1995. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. **FEBS**, **365**: 120-124.
- COOPER, E.L.; PARRINELO, N. Immunodefense in tunicates: cells and molecules. In: Sawada H, Yokosawa H, Lambert CC (eds), **The Biology of Ascidians**. Tokyo: Springer, 2001. p. 383-391.
- DAY, A.A.; MC QUILLAN, C.I.; TERMINE, J.D.; YOUNG, M.R. 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for small proteoglycan II of bovine bone. **Biochem. J.**, **248**: 801-805.
- DE BARROS, M.C.; ANDRADE, L.R.; ALLODI, S.; VISKOV, P.A.; MOURIER, P.A.; CAVALCANTE, C.M.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; POMIM, V.H.; CARVALHO, V.F.; MARTINS, M.A.; PAVÃO, M.S.G. 2007. The hemolymph of the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and an unique sulfated galactoglucan in the plasma. **J. Biol. Chem.** **282**: 1615-1626.
- DE LEO, G.; PATRICOLO, E.; FRITITTA, G. 1981. Fine structure of tunic of *Ciona intestinalis* L. II. Tunic morphology, cell distribution and their functional importance. **Acta Zool.**, **62**: 259-271.
- DE LEO, G. 1992. Ascidian hemocytes and their involvement in defense reactions. **Buoll. Zol.**, **59**: 195-213.

- DE LEO, G.; PARRINELLO, N.; PARRINELLO, D.; CASSARA, G.; RUSSO, D.; DI BELLA, M.A. 1997. Encapsulation response of *Ciona intestinalis* (Ascidiacea) to intratunical erythrocyte injection. **J. Inv. Pathol.**, **69**: 14-23.
- Di BELLA, M.A.; E DE LEO, G. 2000. Hemocyte migration during inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata, Ascidiacea). **J. Invert. Pathol.**, **76**: 105-111.
- DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. 1976. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, **70**: 645-647.
- DU BOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: 350-354.
- DU PASQUIER, L. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. Part B** **129**: 1-15.
- DU PASQUIER, L.; SMITH, L.C. 2003. Workshop report: evolutionary immunobiology – new approaches, new paradigms. **Dev. Comp. Immunol.**, **27**: 263-271.
- DU PASQUIER, L. 2004. Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. **C.R. Biologies**, **327**: 591-601.
- ERMAK, T.H. 1982. The renewing cell populations of ascidians. **Am. Zool.**, **22**: 795–805.
- FARNDALE, W.; R. BETTLE, D.J.; BANET, A.J. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochim. Biophys. Acta**, **883**: 173-177.

- FIALA-MEDIONE, A.; PEQUIGNAT, E. 1980. Direct absorption of amino acids and glucose by the branchial sac and the digestive tract of benthic filter-feeders (ascidians). **J.Zool.**, **192**: 403-419.
- FIORI, G.; POLI, A.; DI COSMO, A.; D'ISCHIA, M.; PALUMBO, A. 2004. Dopamine in ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. **Biochem. J.**, **378**: 785-791.
- FLEURY, P.; EBERHARD, R. 1951. Determination of proteins by photometric, biuret method, according to the technique of Gornall. **Anal. Biol. Clin.**, **9**: 453-466.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade . Metabolismo, síntese e funções. **Ver. Assoc. Med. Brasil**, **46**: 265-271.
- FORD, S.E.; HASKIN, H.H. 1988. Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*, **Comp. Biochem. Physiol.**, **90A**: 183–187.
- FORSBERG, E.; PJELER, G.; RINGVALL, M.; LUNDERIUS, C.; TOMASINI, J.; KUSCHE-GULLBERG, M.; ERIKSSON, I.; LEDIN, J.; HELLMAN, L.; KJELLÉN, L. 1999. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. **Nature**, **400**: 773-776.
- FRANK, G. 1989. Granulopoiesis in tadpoles of *Rana esculenta*. Ultrastructural observations on the morphology and development of heterophil and basophil granules. **J. Anat.**, **163**: 107-116.
- FREEMAN, G. 1964. The role of blood cells in the process of asexual reproduction in the tunicate *Perophora viridis*. **J. Exp. Zool.**, **156**: 157-183.

- FUJITA, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, **2**: 343-356.
- FUJITA, A.; ENDO, Y.; NONAKA, M. 2004. Primitive complement system-recognition and activation. **Mol. Immunol.**, **41**: 103-111.
- FUKE, M.; FUKUMOTO, M. 1993. Correlative fine structural, behavioral, and histochemical analyses of ascidian blood cells. **Acta Zool.**, **74**: 61-71.
- GANDRA, M.; CAVALCANTE, M.; PAVÃO, M. 2000. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). **Glycobiology**, **10**: 1333-1340.
- GOODBODY, I. **The physiology of ascidians**. Adv. Mar. Biol. Vol. 1974. 12 p. 64-67.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMANN, P. 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, **212**: 56-58.
- GREEN, P.L.; NAIR, S.V.; RAFTOS, D.A. 2003. Secretion of a collectin-like protein in tunicates is enhanced during inflammatory responses. **Dev. Comp. Immunol.** **27**: 3-9.
- GRUMETTO, L.; WILDING, M.; De SIMONE M.L.; TOSTI, E.; GALIONI, A.; DALE, B. 1997. Nitric oxide gates fertilization channels in ascidian oocytes through nicotinamide metabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **239**: 723-728.
- GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, **54**: 469-487.

- HATA, S.; AZUMI, K.; YOKOSAWA, H. 1998. Ascidian phenoloxidase: its release from hemocytes, isolation, characterization and physiological roles. **Comp. Biochem. Physiol. Part B.**, **119**: 769-776.
- HENNINGSSON, F.; LEDIN, J.; LUNDERIUS, C.; WILÉN, M.; HELLMAN, L.; PEJLER, G. 2002. Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing. **Biol. Chem.**, **383**: 793-801.
- HENNINGSSON, F.; WOLTERS, P.; CHAPMAN, H.A.; CAUGHEY, G.H.; PEIJER, G. 2003. mast cell cathepsins C and S control levels of carboxypeptidase A and the chymase, mouse mast cell protease 5. **Biol. Chem.**, **384**: 1527-1531.
- HENNINGSON, F.; HERGETH, S.; CORTELIUS, R.; ABRINK, M.; PEJLER, G. 2006. A role for serglycin proteoglycan in granular retention of mast cell secretory granule components. **FEBS**, **273**: 4901-4912.
- HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, **235**: 473-476.
- HILBORN, J.C.; ANASTASSIADIS, P.A. 1969. Acrylamine gel electrophoresis of acidic mucopolysaccharides. **Anal. Biochem.**, **31**: 51-55.
- HIROSE, E.; SAITO, Y.; WATANABE, H. 1997. Subcuticular rejection: an advanced mode of the allogeneic rejection in the compound ascidians *Botrylloides simodensis* and *B. fuscus*. **Biol. Bull.**, **192**: 53-61.
- HIROSE, E.; SHIRAE, M. SAITO, Y. 2003. Ultrastructures and classification of circulating hemocytes in 9 Botryllid ascidians (chordate: ascidiacea). **Zool. Sci.**, **20**: 647-656.

- HYSLOP, L.A.; CAROLL, M.; NIXON, V.L.; MC DOUGALL, A.; JONES, K.T. 2001. Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. **Dev. Biol.**, **234**: 216-230.
- HUMPHRIES, D.E.; WONG, G.W.; FRIEND, D.S.; GURISH, M.F.; QUI, W.T.; HUANG,C.; SHARPE, A.H.; STEVENS, R.L. 1999. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. **Nature**, **400**: 769-772.
- HUTCHINS, M.; THONEY, D.A.; SCHLAGER, N.; HILLS, F. Lower Metazoans and Lesser Deuterostomes. 2^a ed. **Grzimek's Animal Life Encyclopedia**. Vol. 1, MI: grupo Gale, 2003. p. 451-466.
- ICHIKAWA, A. The fine structure of the tunicate heart. 2^a ed. In: UYEDA, R. **Electron microscopy**. Vol.2, Maruzen Co, Tokyo, 1966. p. 695-696.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein in nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 9265-9269.
- IOZZO, R.V. **Proteoglycans – structure, biology, and molecular interactions**. 1^a ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.177-199.
- IWANAGA, S.; LEE, B.L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrates animals. **J. Biochem. Mol. Biol.**, **38**: 128-150.
- JACKLET, J.W. 1995. Nitric oxide is used as an orthograde cotransmitter at identified histaminergics synapses. **J. Neurophysiol.**, **74**: 891-895.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Células do sangue. 10^a ed. **Histologia Básica**. Ganabara Koogan. 2004. p.228-234.
- KALK, M. 1963. Absorption of vanadium by tunicates. **Nature**, **198**: 1010.

- KARHUMEN, T.; PANULA, P. 1991. Histamine in the nervous system of *Macoma balthica* (Bivalvia). **Agents Actions**, **33**: 116-8.
- KASAHARA, M.; SUZUKI, T.; DU PASQUIER, L. 2004. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. **Trends Immunol.**, **25**: 105-111.
- KENJO, A.; TAKAHASHI, M.; ENDO, Y.; NAKATA, M.; MIZUOCHI, T.; FUJITA, T. 2001. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **J. Biol. Chem.**, **276**: 19959-19965.
- KIERSZENBAUM, A. L. Sangue e hematopoiese. 1ª ed. Histologia e Biologia celular – Uma introdução à patologia. Elsevier. 2004. p. 160-163.
- KHALTURIN, K.; PANZER, Z.; COOPER, M.D.; BOSCH, T.C.G. 2004. Recognition strategies in the innate immune system of ancestral chordates. **Mol. Immunol.**, **41**: 1077-1087.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, **298**: 249-258.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680–685.
- LEONE, A.M.; RHODES, P.; FURST, V.; MONCADA, S. **Techniques for the measurement of nitric oxide in Signal Transduction Protocols**. In: Kendall DA, Hill SJ. editors. Humana Press, Totowa, New Jersey 1995. p. 285-299.
- MACGLASHAN, D. 2003. Histamine: A mediator of inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **112**: S53-91.

- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, **27**: 8706-8711.
- MARTINEZ-SILVESTRE, A.; RODRIGUEZ DOMÍNGUEZ, M.A.; MATEO, J.A.; PASTOR, J.; MARCO, I.; LAVÍN, S.; CUENCA, R. 2004. Comparative haematology and blood chemistry of endangered lizards (*Gallotia* species) in the Canary Islands. **Vet. Rec.**, **155**: 266-269.
- MARTINÉZ-SILVESTRE, A.; MARCO, I.; RODRIGUEZ-DOMINGUEZ, M.A.; CUENCA, R. 2005. Morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of the blood cells of the giant lizard of El Hierro (*Gallotia simonyi*). **Res. Vet. Sci.**, **78**: 127-134.
- MATHIAS, A.T.; ROSS, D.M.; SCHACHTER, M. 1960. The distribution of 5-hydroxytryptamine, tetramethylammonium, homarine and other substances in sea anemone. **J. Physiol.**, **151**: 296-311.
- MATUSZEK, M.A.; HODGSON, W.C.; SUTHERLAND, S.K.; KING, R.G. 1992. Pharmacological studies of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) Venon: Evidence for the presence of histamine, and haemolytic and eicosanoid-releasing factors. **Toxicol.**, **30**: 1081-1092.
- MILLAR, R.H.; 1953. On a collection of ascidians from the Gold Coast. **Proc. Zool. Soc. London.**, **123**: 277-325.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. 2006. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handb. Exp. Pharmacol.**, **176**: 213-254.

- MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; LABOUTE, P. Paris: Orstom, **Coral reefs ascidians of New Caledonia**. 1991.p. 1-147.
- MOROZ, L.L.; GILLETTE, R. 1996. NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. **J. Comp. Neurol.**, **367**: 607-622.
- MOTA, I.; 1995. The mast cell revisited. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, **28**: 895-901.
- MOURÃO, P.A.; ASSREUY, A.M. 1995. Trehalose as a possible precursor of the sulfated L-galactan in the ascidian tunic. **J. Biol. Chem.** **270**: 3132-3140.
- MOURRIER, P.A.J.; VISKOV, C. 2004. Chromatographic analysis and sequencing approach of heparin oligosaccharides using cetyltrimethylammonium dynamically coated stationary phases. **Anal. Biochem.**, **332**: 299-313.
- MUKAI, H.; WATANABE, H. 1976. Studies on the formation of germ cells in a compound ascidian *Botryllus primigenus*. **Oka. J. Morph.**,**148**: 337-362.
- NADER, H.B.; PINHAL, M.A.; BAÚ, E.C.; CASTRO, R.A.; MEDEIROS, G.F.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L.; TRINDADE, E.S.; SHINJO, S.K.; ROCHA, H.A.; TERSARIOL, I.L.; MENDES, A.; DIETRICH, C.P. 2001. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **34**: 699-709.
- NONAKA, M.; AZUMI, K. 1999. Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Dev. Comp. Immunol.**, **23**: 421-427.
- NONAKA, M. 2001. Evolution of the complement system. **Curr. Opin. Immunol.**, **13**: 69-73.

- OTTAVIANI, E.; PAEMAN, L.R.; CADET, P.; STEFANO, G.B. 1993. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, **248**: 319-324.
- PALUMBO, A. 2005. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, **142**: 241-248.
- PARRINELO N.; PATRICOLO, E. 1975. Erythrocyte agglutinins in the blood of certain ascidians. **Experientia**, **31**:1092-1093.
- PAVÃO, M.S.G. 1996. Unique sulfated polysaccharides from ascidians (Chordata, Tunicata). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **29**: 1227-1233.
- PAVÃO, M.S.G.; AIELLO, K.R.M.; WERNECK, C.C.; DA SILVA, L.C.F.; VALENTE, A.P.; MULLOY, B.; CLOWELL, N.S.; TOLLEFSEN, D.M.; MOURÃO, P.A.S. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **J. Biol. Chem.**, **273**: 27848-27857.
- PEARCE, A.N.; BABCOCK, R.C.; BATTERSHILL, C.N.; LAMBERT, G.; COPP, B.R. 2001. Enantiomeric 1,2,3-trithiamine-containing alkaloids and two new 1,3-dithiane alkaloids from New Zealand ascidians. **J. Org. Chem.**, **66**: 8257-8259.
- PEDDIE, C.M.; SMITH, V.J. 1994. Blood cell-mediated cytotoxic activity in the solitary ascidian *Ciona intestinalis*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **712**: 332-334.
- RADFORD, J.L.; HUTCHINSON, A.E.; BURANDT, M.; RAFTOS, D.A. 1998. A hemocyte classification scheme for the tunicate *Styela plicata*. **Acta. Zool.** **79**: 343-350.
- RAFTOS, D.A.; TAIT, N.N.; BRISCOE, D.A. 1987. Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata*. **Dev. Comp. Immunol.**, **11**: 713-725.

- RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 160-162.
- REITE, O.B. 1973. Effect of physical and chemical agents on the blood mast cells (basophil leucocytes) of turtles. **Acta. Physiol. Scand.**, **87**: 549-556.
- RIVERO, A. 2006. Nitric Oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. **Immun. Series.**, **22**: 219-226.
- ROWLEY, A.F. 1981. The blood cells of the sea squirt, *Ciona intestinalis*: morphology, differential counts, and in vitro phagocytic activity. **J. Invert. Pathol.**, **37**: 91-100.
- SAITO, H.; YAMAGATA, T.; SUZUKI, S. 1968. Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, **243**: 1536-1542.
- SAWADA, T.; ZHANG, J.; COOPER, E.L. 1993. Classification of hemocytes in *Styela clava*. **Biol. Bull.**, **184**: 87-96.
- SELDIN, D.C.; AUSTEN, K.F.; STEVENS, R.L. 1985. Purification and characterization of protease-resistant secretory granule proteoglycans containing chondroitin sulfate di-B and heparin- like glycosaminoglycans from rat basophilic leukemia cells. **J. Biol. Chem.**, **260**: 11131-11139.
- SEKINE, H.; KENJO, A.; AZUMI, K.; OHI, G.; TAKAHASHI, M.; KASUKAWA, R.; ISHIKAWA, N.; NAKATA, M.; MISUOCHI, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. 2001. An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **J. Immunol.**, **167**: 4504-4510.

- SHARON, J. Imunidade à infecção. 4ª ed. **Imunologia Básica**. Brasil: Guanabara-Koogan. 2000. p. 115-130.
- SHIGEI, T.; TSURU, H.; ISHIKAWA, N.; YOSHIOKA, K. 2001. Absence of Endothelium in Invertebrate Blood Vessels: Significance of Endothelium and Sympathetic Nerve/Medial Smooth Muscle in the Vertebrate Vascular System. **Japan. J. Pharmacol.** **87**: 253-260.
- SHIRAE, M.; BALLARIN, L.; FRIZZO, A.; SAITO, Y.; HIROSE, E. 2002. Involvement of quinines and phenoloxidase in the allorejection reaction in a colonial ascidian, *Botrylloides simodensis*: Histochemical and immunohistochemical study. **Mar. Biol.**, **141**: 659-665.
- SHISHIKURA, F.; ABE, T.; OHTAKE, S.; TANAKA, K. 1997. Purification and characterization of a 39,000-Da serine proteinase from the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Com. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, **118**: 131-141.
- SHIVELY, J.E.; CONRAD, H.E. 1976. Isotopic procedures in the structural analysis of heparin. **Fred. Proc.**, **36**: 28-31.
- SNYDER, R.H.; BALDESSARINI, R.J.; AXELROD, R. 1966. A sensitive and specific enzymatic isotopic assay for tissue histamine. **J. Pharmacol. Exp.**, **153**: 544-549.
- STEFANO, G.B.; OTTAVIANI, E. 2002. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. **Brain. Res.**, **924**: 82-89.

- STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82:** 7738-7742.
- STUART, A.E. 1999. From fruit flies to barnacles, histamine is the neurotransmitter of arthropod photoreceptors. **Neuron, 22:** 431-433.
- TAFALLA, C.; GOMEZ-LEON, J.; NOVOA, B.; FIGUEIRAS, A. 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. **Dev. Comp. Immunol., 27:** 197-205.
- TAKAHASHI, H.; AZUMI, K.; YOKOSAWA, H. 1995. A novel membrane glycoprotein involved in ascidian hemocyte aggregation and phagocytosis. **Eur. J. Biochem., 233:** 778-783.
- TASHEVA, E.S.; FUNDERBURGH, J.L.; CORPUZ, L.M.; CONRAD, G.W. 1998. Cloning, characterization and tissue-specific expression of the gene encoding bovine keratocan, a corneal keratan sulfate proteoglycan. **Gene, 218:** 63-68.
- VAN DER VEEN, R.C. 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity. **Int. Immunopharmacol. 1:** 1491-1500.
- VIJAVABASKAR, P.; BALASUBRAMANIAN, T.; SOMASUNDARAM, S.T. 2008. Low-molecular weight molluscan glycosaminoglycan from bivalve *Katelysia opima* (Gmelin). **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 3:** 175-180.
- WALLACE, J.L. 2005. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100:** 5-9.
- WANG, X.W.; TAN, N.S.; HO, B.; DING, J.L. 2006. Evidence for the ancient origin of the NF- κ B/I κ B cascade: Its archaic role in pathogen infection and immunity. **PNAS, 103:** 4204-4209.

- WEST, G.B. 1990. Histamine, mast cells and basophils. **Chem. Immunol. Basel. Karger. 49:** 121-142.
- WRIGHT, R.K. Urochordates. In: Ratcliffe NA, Rowley AF. editors. **Invertebrate Blood Cells.** Academic Press, London, 1981 p. 565-626.
- YAGI, K.; SATOU, Y.; MAZET, F.; SHIMELD, S.M.; DEGNAN, B.; ROKHSAR, D.; LEVINE, M.; KOHARA, Y.; SATOH, N. 2003. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. **Dev. Genes Evol., 213:** 235-244.
- YOKOSAWA, H.; ODAJIMA, R.; ISHII, S. 1985. Trypsin inhibitor in the hemolymph of a solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. Purification and characterization. **J. Biochem. 97:** 1621-1630.
- ZUCKER-FRANKLIN, D.; HIRSCH, J.G. 1964. Electron microscope studies on the degranulation of rabbit peritoneal leukocytes during phagocytosis. **J. Exp. Med., 120:** 569-576.

The Hemolymph of the Ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) Contains Heparin inside Basophil-like Cells and a Unique Sulfated Galactoglycan in the Plasma*^[5]

Received for publication, April 27, 2006, and in revised form, November 16, 2006. Published, JBC Papers in Press, November 17, 2006, DOI 10.1074/jbc.M604056200

Cintia M. de Barros^{‡§}, Leonardo R. Andrade^{§¶}, Silvana Allodi^{§¶}, Christian Viskov^{||}, Pierre A. Mourier^{||}, Moisés C. M. Cavalcante[‡], Anita H. Straus^{**1}, Helio K. Takahashi^{**1}, Vitor H. Pomin[‡], Vinicius F. Carvalho^{**}, Marco A. Martins^{††1}, and Mauro S. G. Pavão^{†1,2}

From the [‡]Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Instituto de Bioquímica Médica, [§]Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, and [¶]Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-590, Brasil, ^{||}Sanofi-aventis, Centre de Recherche de Paris, Unité de Glycochimie, Batiment Lavoisier 13, Quai Jules Guesde 94400 Vitry-sur Seine, France, ^{**}Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 04023-900 SP, Brasil, and ^{††}Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, CEP 21045-900, Brasil

The hemolymph of ascidians (Chordata-Tunicata) contains different types of hemocytes embedded in a liquid plasma. In the present study, heparin and a sulfated heteropolysaccharide were purified from the hemolymph of the ascidian *Styela plicata*. The heteropolysaccharide occurs free in the plasma, is composed of glucose (~60%) and galactose (~40%), and is highly sulfated. Heparin, on the other hand, occurs in the hemocytes, and high performance liquid chromatography of the products formed by degradation with specific lyases revealed that it is composed mainly by the disaccharides $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$ (39.7%) and $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ (38.2%). Small amounts of the 3-O-sulfated disaccharides $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$ (9.8%) and $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ (3.8%) were also detected. These 3-O-sulfated disaccharides were demonstrated to be essential for the binding of the hemocyte heparin to antithrombin III. Electron microscopy techniques were used to characterize the ultrastructure of the hemocytes and to localize heparin and histamine in these cells. At least five cell types were recognized and classified as univacuolated and multivacuolated cells, amebocytes, hemoblasts, and granulocytes. Immunocytochemistry showed that heparin and histamine co-localize in intracellular granules of only one type of hemocyte, the granulocyte. These results show for the first time that in ascidians, a sulfated galactoglycan circulates free in the plasma, and heparin occurs as an intracellular product of a circulating basophil-like cell.

Heparin is a highly sulfated glycosaminoglycan (GAG)³ made up of a mixture of polymers with a similar backbone of repeating hexuronic acid ($\alpha\text{-L-iduronic acid}$ or $\beta\text{-D-glucuronic acid}$) linked 1,4 to $\alpha\text{-D-glucosamine}$ units. The heparin molecules possess a high heterogeneity, which results from different substitutions on the D-glucosamine (N-acetylated, N-sulfated, O-sulfated at C6 and/or C3) and on the uronic (glucuronic or iduronic) acid residue (O-sulfated at C2) (for reviews, see Refs. 1–4).

In mammals, heparin is synthesized on to a specific protein core, forming the serglycin proteoglycans (PGs) (5–9). These PGs occur in secretory granules of some immunologic cells, such as mast cells and basophils (10–12). In basophils, different from mast cells, the serglycin core protein is substituted exclusively with oversulfated chondroitin sulfate chains (13). Mature mast cells are not found in blood but reside in peripheral mucosa or connective tissue interstice. Basophils, on the other hand, circulate in the blood (14, 15).

In invertebrates, heparin has been reported to occur in different species of mollusks (16–22), crustaceans (23–27), and ascidians (28–30). In the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata), a heparin composed mainly by the disaccharide $\alpha\text{-L-iduronic acid 2-sulfate-}1\rightarrow 4\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$, with a minor contribution (~25%) of the disaccharide $\alpha\text{-L-iduronic acid-}1\rightarrow 4\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ was detected in intracellular granules of accessory cells, named test cells, that reside in the perivitelline space of oocytes (28). Because of the morphological and biochemical similarities between ascidian test cells and mammalian mast cells, we have hypothesized that these cells could be evolutionarily related. Other cell types in this ascidian,

* This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro and by National Institutes of Health Fogarty International Center Grant R03 TW05775 (to M. S. G. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 3C.

¹ Research fellows of CNPq.

² To whom correspondence should be addressed: Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brasil. Tel.: 55-21-2562-2093; Fax: 55-21-2562-2090; E-mail: mpavao@hucff.ufrj.br.

³ The abbreviations used are: GAG, glycosaminoglycan; ΔUA , $\alpha\text{-}\Delta^{4,5}$ -unsaturated hexuronic acid; $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)$, $\alpha\text{-}\Delta^{4,5}$ -unsaturated hexuronic acid 2-sulfate; $\text{GlcN}(\text{SO}_4)$, $\text{GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$, and $\text{GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$, derivatives of D-glucosamine, bearing a sulfate ester at position N, at both positions N and 6, and at positions N, 3, and 6, respectively; $\text{GlcNAc}(6\text{SO}_4)$, N-acetyl-D-glucosamine 6-sulfate; HPLC, high performance liquid chromatography; FPLC, fast protein liquid chromatography; PG, proteoglycan; PBS, phosphate-buffered saline; CTA, cetyltrimethylammonium; SAX, strong anion exchange; GlcA, gluconic acid.

located at the lumen of pharynx and intestine, have also been shown to contain intracellular heparin (28).

The hemolymph of ascidians contains different types of circulating blood cells (31–34). Some of these cells migrate from hemolymph to tissues, where they carry out several immunologic actions, such as phagocytosis of self and non-self molecules, expression of cytotoxic agents, encapsulation of antigens, and also repair of damaged tissues (35). In the ascidian *S. plicata*, the hemocytes have been classified by light microscopy by Radford *et al.* (32). The authors described eight individual cell types: hemoblast, lymphocyte-like cell, signet ring cell, refractile vacuolated cell, nonrefractile vacuolated cell, pigment cell, fried egg cell, and fine granular cell.

As mentioned earlier, in evolved chordates, intracellular GAGs are restricted to immunologic cells that either reside in the tissues (mast cells) or circulate in the blood (basophils) (15). Considering the phylogenetic position of ascidians and taking into account that a heparin-containing cell, similar to a mammalian mast cell, was detected in the tissues of *S. plicata*, it is possible that a basophil-like cell containing intracellular GAGs circulates in the hemolymph of this invertebrate chordate. To investigate this hypothesis, we submitted the hemolymph of *S. plicata* to proteolytic digestion before and after separation of plasma and hemocytes and analyzed the extracted and purified sulfated glycans. In addition, ultrastructural and immunocytochemical studies were carried out to characterize and determine which hemocytes express these glycans. Our results reveal the occurrence of two sulfated glycans in the hemolymph of this ascidian: heparin, which is present in intracellular granules of a circulating basophil-like cell, and a sulfated galactoglucan, which occurs free in the plasma. These results show for the first time the presence of heparin in a circulating basophil-like cell in an invertebrate chordate and may contribute toward the understanding of the evolution of the immune system in this phylum.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Heparan sulfate from human aorta was extracted and purified as described previously (36). Chondroitin 4-sulfate from whale cartilage, dermatan sulfate and heparin from porcine intestinal mucosa (140 units/mg), twice-crystallized papain (15 units/mg protein), and the standard disaccharides α - Δ UA-1 \rightarrow 4-GlcN(SO₄), α - Δ UA-1 \rightarrow 4-GlcNAc(6SO₄), α - Δ UA(2SO₄)-1 \rightarrow 4-GlcNAc, α - Δ UA(2SO₄)-1 \rightarrow 4-GlcN(SO₄), α - Δ UA(2SO₄)-1 \rightarrow 4-GlcNAc(6SO₄), α - Δ UA-1 \rightarrow 4-GlcN(SO₄)(6SO₄), and α - Δ UA(2SO₄)-1 \rightarrow 4-GlcN(SO₄)(6SO₄) were purchased from Sigma; chondroitin AC lyase (EC 4.2.2.5) from *Arthrobacter aurescens*, chondroitin ABC lyase (EC 4.2.2.4) from *Proteus vulgaris*, and heparan sulfate lyase (EC 4.2.2.8) and heparin lyase (EC 4.2.2.7) from *Flavobacterium heparinum* were from Seikagaku America Inc. (Rockville, MD). For HPLC-SAX experiments, the enzymes from *F. heparinum* heparinase I (EC 4.2.2.7), heparinase II (no EC number), and heparinase III (EC 4.2.2.8) were obtained from Grampian Enzymes (Aberdeen). Agarose (standard low *M_r*) was obtained from Bio-Rad; toluidine blue was from Fisher; 1,9-dimethyl-methylene blue was from Serva Feinbiochimica (Heidelberg,

Germany); human antithrombin and thrombin were from Hematologic Technologies Inc. or from Hyphen Biomed; and thrombin chromogenic substrate tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*-nitroanilide acetate (Chromozyn TH) was from Roche Applied Science. Histamine *N*-methyltransferase was partially purified from guinea pig brain according to Brown *et al.* (37), and aliquots were stored at -20°C . *S*-Adenosyl[*methyl*-³H]methionine was purchased from PerkinElmer Life Sciences and neutralized with an equal volume of 0.1 M NaOH immediately before use. Unlabeled telemethylhistamine (Sigma) was diluted in 1 mM acetic acid and stored at 4°C . Chloroform (Merck) was used fresh for the organic extraction procedure.

Collection of Tunicates

Adult individuals of *S. plicata* were collected at Praia da Urca (Guanabara Bay), Rio de Janeiro, Brazil, and maintained in an aerated aquarium containing filtered sea water at 20°C until use.

Isolation of the Hemocytes

The hemolymph was harvested from the heart by direct puncture and collected into plastic tubes containing an equal volume of marine anticoagulant, containing 0.45 M sodium chloride, 0.1 M glucose, 0.01 M trisodium citrate, 0.01 M citric acid, and 0.001 M EDTA (pH 7.0) (38). After harvesting, the hemocytes were separated from plasma by centrifugation ($130 \times g$ for 10 min at room temperature).

Extraction of the Sulfated Polysaccharides

The hemocytes were immersed in acetone and kept for 24 h at 4°C . The dried hemocytes (1 g) were suspended in 20 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5), containing 100 mg of papain, 5 mM EDTA, and 5 mM cysteine and incubated at 60°C for 24 h. The incubation mixture was then centrifuged ($2000 \times g$ for 10 min at room temperature), the supernatant was separated, and the precipitate was incubated with papain two more times, as described above. The clear supernatants from the three extractions were combined, and the polysaccharides were precipitated with 2 volumes of 95% ethanol and maintained at 4°C for 24 h. The precipitate formed was collected by centrifugation ($2000 \times g$ for 10 min at room temperature) and freeze-dried. For the extraction of the plasma polysaccharides, after the removal of the hemocytes, the plasma was dialyzed against distilled water, lyophilized, and incubated with papain, as described above.

Purification of the Polysaccharides

The glycans obtained from plasma (~ 8 mg) were applied to a Q Sepharose-FPLC column, equilibrated with 20 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0). The glycans were eluted by a linear gradient of 0–2.0 M NaCl (150 ml) at a flow rate of 2.0 ml/min. Fractions of 1.5 ml were collected and checked by a metachromatic assay using 1,9-dimethyl-methylene blue (39). Fractions eluted with different NaCl concentrations were pooled as indicated in Fig. 2A, dialyzed against distilled water, and lyophilized.

The glycans (~ 2 mg) obtained from hemocytes or porcine heparin (~ 1 mg) were applied to a Mono Q-FPLC column, equilibrated with 20 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0). The glycans

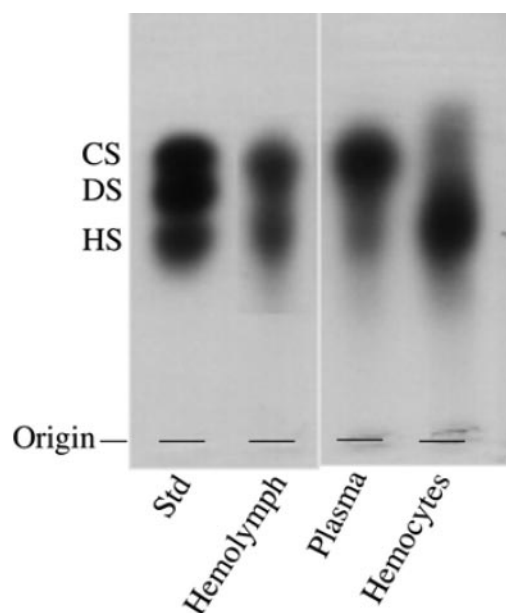


FIGURE 1. Agarose gel electrophoresis of the crude glycans isolated from total hemolymph, plasma, and hemocytes. The hemolymph of *S. plicata* was collected and fractionated into plasma and hemocytes by centrifugation, as described under "Experimental Procedures." The hemolymph, plasma, or hemocytes were submitted to proteolytic digestion, and the extracted glycans ($\sim 1.5 \mu\text{g}$, as uronic acid) were applied to a 0.5% agarose gel in 0.05 M 1,3-diaminopropane/acetate (pH 9.0), along with a mixture of standard (Std) glycosaminoglycans, containing chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), and heparan sulfate (HS).

were eluted by a linear gradient of 0–2.0 M NaCl (45 ml) at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected and checked by metachromatic assay using 1,9-dimethyl-methylene blue. Fractions eluted with different NaCl concentrations were pooled as indicated in Fig. 4A, dialyzed against distilled water, and lyophilized.

Electrophoretic Analysis

Agarose Gel—The crude or purified glycans from plasma ($\sim 10 \mu\text{g}$ dry weight) or hemocytes ($1.5 \mu\text{g}$ as uronic acid), before or after incubation with specific GAG lyases or deaminative cleavage with nitrous acid were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described previously (40). Briefly, the glycans and a mixture of standard GAGs, containing chondroitin sulfate, dermatan sulfate, and heparan sulfate ($1.5 \mu\text{g}$ as uronic acid of each), were applied to a 0.5% agarose gel in 0.05 M 1,3-diaminopropane/acetate (pH 9.0) and run for 1 h at 110 mV. After electrophoresis, the glycans were fixed with aqueous 0.1% cetyltrimethylammonium bromide solution and stained with 0.1% toluidine blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5, v/v/v).

Polyacrylamide Gel—The molecular masses of the purified glycans from plasma and hemocytes were estimated by polyacrylamide gel electrophoresis. Samples ($\sim 10 \mu\text{g}$) were applied to a 1-mm-thick 6% polyacrylamide slab gel, and after electrophoresis at 100 V for ~ 1 h in 0.06 M sodium barbital (pH 8.6), the gel was stained with 0.1% toluidine blue in 1% acetic acid. After staining, the gel was washed overnight in 1% acetic acid. The molecular mass markers used were dextran 500 (average M_r 500,000), chondroitin 6-sulfate from shark cartilage (average M_r 60,000), chondroitin 4-sulfate from whale cartilage

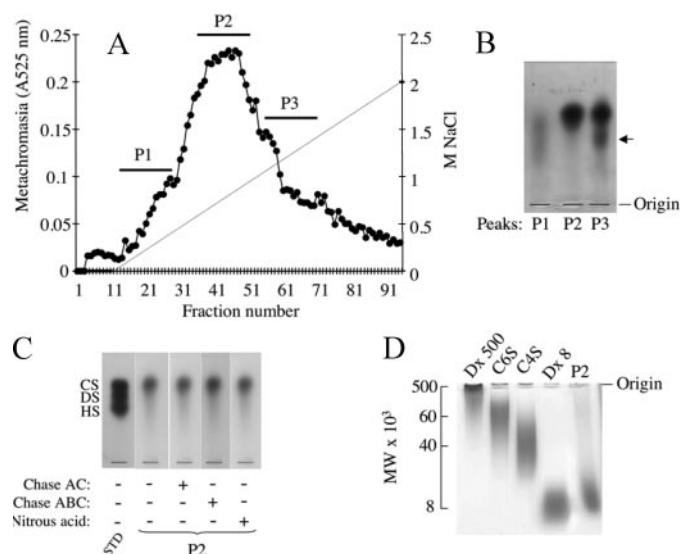


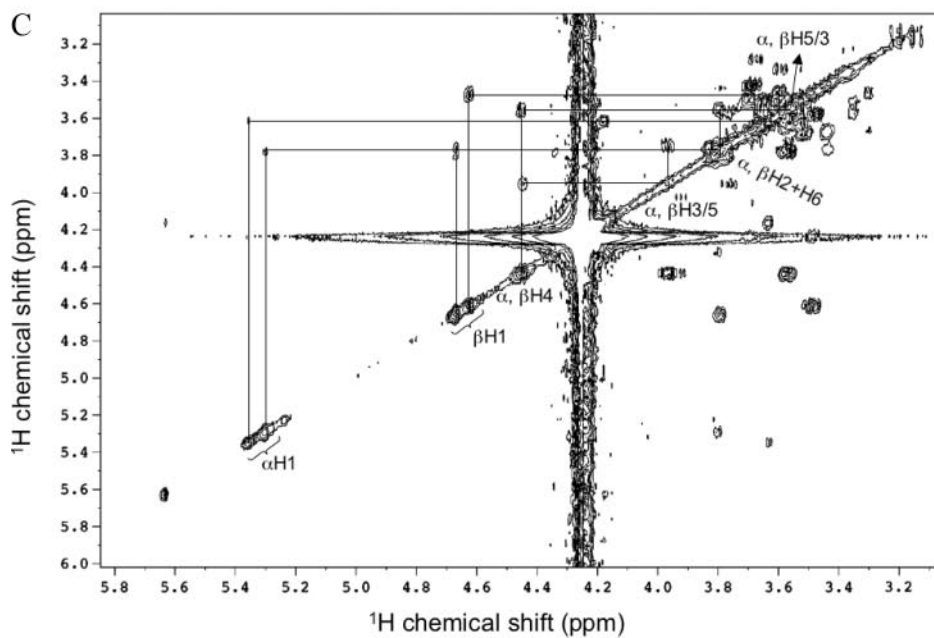
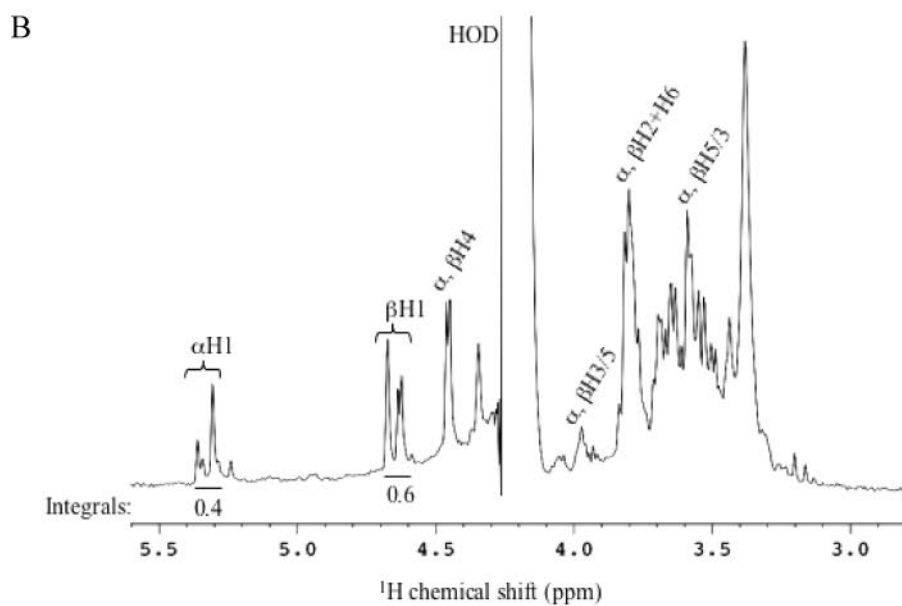
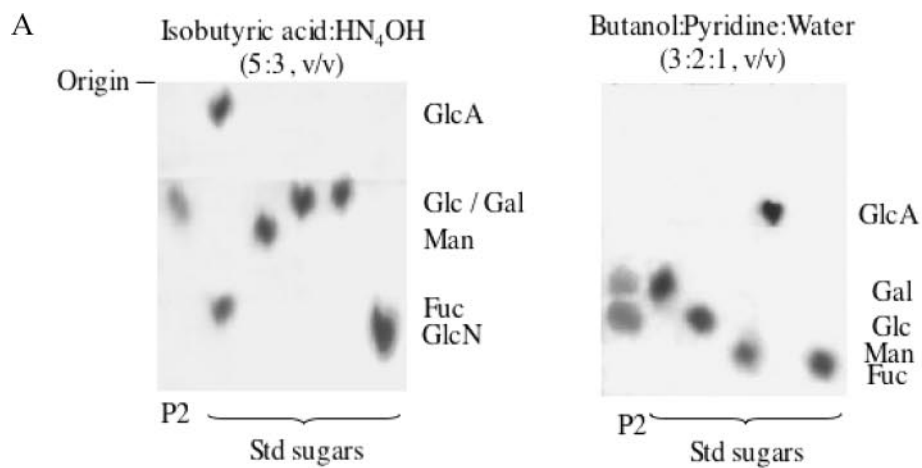
FIGURE 2. Isolation and characterization of the sulfated polysaccharide from plasma. A, about 8 mg of the sulfated polysaccharide from plasma were applied to a Q Sepharose-FPLC column as described under "Experimental Procedures." Fractions were assayed for metachromasia (\bullet) and NaCl (-----) concentration. B, fractions under the peaks denominated P1, P2, and P3 were pooled, dialyzed against distilled water, lyophilized, and analyzed by agarose gel electrophoresis, as described in the legend to Fig. 1. C, the purified sulfated polysaccharide from plasma (P2) ($\sim 10 \mu\text{g}$ dry weight) was analyzed by agarose gel electrophoresis, before (–) or after (+) incubation with chondroitin AC (Chase AC) or ABC (Chase ABC) lyases or deaminative cleavage with nitrous acid, as described under "Experimental Procedures." D, P2 and the molecular weight markers dextran 500, chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and dextran 8 ($\sim 10 \mu\text{g}$ as dry weight of each) were applied to a 1-mm-thick 6% polyacrylamide slab gel, as described under "Experimental Procedures."

(average M_r 40,000), porcine intestinal mucosa heparin (average M_r 18,000), and dextran 8 (average M_r 8,000).

CTA-SAX Chromatography of Heparin Digests—To prepare the digests, exhaustive digestion of heparin (0.1 mg) was performed at room temperature for 48 h with a mixture of 2.5 mIU of heparinase I, 2.5 mIU of heparinase II, and 2.5 mIU of heparinase III in a total volume of 30 μl of 100 mM sodium acetate buffer, pH 7.0, containing 2 mM $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ and 2 mg/ml bovine serum albumin. The columns used for the chromatography of the heparin digests were dynamically coated with CTA, as described earlier (41). The eluting salt was ammonium methane sulfonate, prepared by neutralization until pH 2.5 of methane sulfonic acid by aqueous ammonia solutions. The solvent B of CTA-SAX was 2 M ammonium methane sulfonate at pH 2.5. The solvent A was water (quality Milli-Q) brought to pH 3 by the addition of methane sulfonic acid. A linear gradient starting from 1% B to 100% B within 74 min was used at a flow rate of 0.22 ml/min. After 74 min, the percentage of B remained at 100%. After each run, a reconditioning step of 18 min was used. Column temperature was 40 $^\circ\text{C}$.

Enzymatic Treatments

Chondroitin Lyases—The ascidian glycans ($\sim 100 \mu\text{g}$) were incubated with 0.01 units of chondroitin AC or ABC lyase in 0.1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), containing 5 mM EDTA and 15 mM sodium acetate. After incubation at 37 $^\circ\text{C}$ for 12 h, another 0.01 units of enzyme was added to the mixture, and the reaction continued for an additional 12-h period.



Heparan Sulfate and Heparin Lyases—About 50 μg (as dry weight of each) of the glycans extracted from the ascidian tissues were incubated with 0.005 units of either heparan sulfate lyase or heparin lyase in 100 μl of 100 mM sodium acetate buffer (pH 7.0), containing 10 mM calcium acetate for 17 h at 37 °C. At the end of the incubation period, the mixtures were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described earlier.

Hexuronic Acid—The hexuronic acid content of the glycans from the various tissues was estimated by the carbazole reaction (42).

Deaminative Cleavage with Nitrous Acid—Deaminative cleavage with nitrous acid of the sulfated glycans was performed as described by Shively and Conrad (43).

Chemical Analyses—Total hexose was measured by the phenol-sulfuric acid method of DuBois *et al.* (44). After acid hydrolysis (6.0 N trifluoroacetic acid, 100 °C for 5 h), total sulfate was determined by the BaCl_2 -gelatin method (45). The proportions of the different hexoses in the acid hydrolysates were determined by paper chromatography in butanol/piridine/water (3:2:1, v/v/v) for 36 h or in isobutyric acid, 1.0 NH_4OH (5:3, v/v). The sugars were detected on the chromatogram by silver nitrate staining.

NMR Spectroscopy— ^1H spectra were recorded using a Bruker DRX 600 with a triple resonance probe. About 3 mg of the purified plasma polysaccharide was dissolved in 0.5 ml of 99.9% D_2O (CIL). All spectra were recorded at 60 °C with hydrogen oxygen deuterium suppression by presaturation. The correlation spectroscopy (COSY) spectrum was recorded using states-TPPI (states-time proportion phase incrementation) for quadrature detection in the indirect dimension. All chemical shifts were relative to external trimethylsilylpropionic acid for ^1H .

Antithrombin III Affinity Chromatography—The polysaccharide (10 mg) was chromatographed on an ATIII-Sepharose column (15 \times 2.6 cm). The column was prepared by bounding 100 mg of human ATIII (Hyphen Biomed) on cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (Sigma). The polysaccharide fraction was eluted by NaCl solution. The low affinity fraction was eluted out of the column at 0.25 M NaCl solution buffered at pH 7.4 with Tris (10 mM) and desalted on Sephadex G10. The high affinity fraction was eluted with 3 M NaCl, 10 mM Tris and desalted on Sephadex G10.

Inhibition of Thrombin by Antithrombin in the Presence of Mammalian or Hemocyte Heparins—These effects were evaluated by the assay of amyolytic activity of thrombin, using chromogenic substrate, as described (28). Incubations were performed in disposable UV semimicrocuvettes. The final concentrations of reactants included 50 nM antithrombin, 15 nM thrombin, and 0–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin in 100 μl of 0.02 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, and 1.0 mg/ml polyethylene glycol (pH 7.4) (TS/PEG buffer). Thrombin was added last to initiate the reaction. After a 60-s incubation at room temperature, 500 μl of

100 μM chromogenic substrate Chromogenix TH in TS/PEG buffer was added, and the absorbance at 405 nm was recorded for 100 s. The rate of change of absorbance was proportional to the thrombin activity remaining in the incubation. No inhibition occurred in control experiments in which thrombin was incubated with antithrombin in the absence of heparin; nor did inhibition occur when thrombin was incubated with heparin alone over the range of concentrations tested.

Conventional Transmission Electron Microscopy—The hemocytes were fixed in 2.5% glutaraldehyde EM grade, 4% formaldehyde freshly prepared from paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) under microwaves (Laboratory Microwaves Processor, Pelco model RFS59MP; 2.45 GHz) for 10 s twice at 45 °C and rinsed twice in cacodylate buffer for 15 min at room temperature. The samples were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) in a microwave oven for 10 s, dehydrated through a graded series of acetone, and embedded in epoxy resin Poly/Bed 812 (Polyscience, Inc.). Ultrathin sections (80 nm) were obtained (LKB ultramicrotome) and collected on copper grids (300 mesh). The sections were stained with 2% uranyl acetate for 20 min and 1% lead citrate for 5 min. The samples were observed in a Zeiss 900 EM electron microscope, operated at 80 kV.

Immunocytochemistry—Circulating hemocytes were slightly centrifuged from hemolymph and fixed overnight in 4% formaldehyde, 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) and 4% 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Sigma) at 4 °C. The samples were washed with 0.05% sodium borohydride in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2), dehydrated in a graded series of methanol until 95%, and embedded in LR Gold acrylic resin at room temperature. Ultrathin sections (90 nm) were obtained and collected on nickel grids (300 mesh).

The sections were hydrated in phosphate-buffered saline (PBS) (1%) for 10 min, and nonspecific sites were blocked with 1% bovine serum albumin in 1% PBS containing 50 mM ammonium chloride for 10 min. The samples were incubated overnight in a humid chamber with anti-heparin monoclonal antibody (46) or anti-histamine polyclonal antibodies (Chemicon) diluted in 1% PBS. After washing with 1% PBS, the sections were incubated with secondary goat anti-mouse or anti-rabbit 10-nm gold-conjugated IgM antibody (Sigma) for 3 h and washed in 1% PBS containing 1% bovine serum albumin and finally with distilled water. The sections were stained with 1% uranyl acetate for 20 min. The controls were done omitting the incubation with the primary antibody.

Histamine N-Methyltransferase Activity—Tissues of *S. plicata* (intestine, hemolymph, and pharynx) as well as a preparation of rat peritoneal mast cells were homogenized with PBS (1%, v/v), subjected to three consecutive cycles of freeze and thaw, and then centrifuged at 1,500 $\times g$ for 10

FIGURE 3. **Chemical analysis of the sulfated polysaccharide from plasma.** A, paper chromatography. The purified sulfated polysaccharide from plasma was hydrolyzed with 6.0 N trifluoroacetic acid at 100 °C for 5 h. The hexoses formed were spotted on Whatman No. 1 paper and subjected to chromatography in butanol/piridine/water (3:2:1, v/v/v) or isobutyric acid, 1 N NH_4OH (5:3, v/v) for 36 h. The sugars were detected on the chromatogram by silver nitrate staining. The following monosaccharides were used as standards: GlcA, Glc, Gal, Man, fucose (*Fuc*), and GlcN. B, NMR spectroscopy. ^1H spectra were recorded using a Bruker DRX 600 with a triple resonance probe. About 3 mg of the purified plasma polysaccharide was dissolved in 0.5 ml of 99.9% D_2O (CIL). HOD, hydrogen oxygen deuterium. The integrals listed under the region of anomeric protons were normalized to the total hexose-H1 intensity.

min. Supernatants were then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until total protein and histamine quantification. Total protein content was spectrophotometrically quantified (540 nm) in the supernatant by means of the Biuret technique (47). Histamine content was estimated in the supernatant by the radioenzymatic technique of Snyder *et al.* (48), modified by Côrrea and Saavedra (49). Briefly, the assay was carried out in a final volume of 60 μl , consisting of 10 μl of standard histamine solution or tissue extract and 50 μl of a freshly prepared mixture containing histamine *N*-methyltransferase preparation, 0.125 μCi of *S*-adenosyl[*methyl*- ^3H]methionine, and 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.9. Measurements were made in duplicate, and the blanks were prepared by replacing the sample test with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.9. After sample incubation overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the enzymatic reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of 1 M NaOH containing 10 μl of the unlabeled methylhistamine carrier. The [^3H]methylhistamine formed was then extracted into 3 ml of chloroform. After evaporation of the organic phase, the radioactivity was counted with a Beckman LS-100 Scintilograph.

RESULTS

The Hemolymph of S. plicata Contains Different Sulfated Polysaccharides—Ascidian hemolymph contains different types of cells, named hemocytes, embedded in liquid plasma. In order to investigate the presence of sulfated polysaccharides, the hemolymph was subjected to proteolytic treatment with papain, and the extracted material was analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 1). Two main metachromatic bands with different electrophoretic motilities, corresponding to two different sulfated polysaccharides, were observed in the gel. The low mobility band possesses the same migration as standard heparan sulfate, whereas the band with the higher electrophoretic mobility migrates as standard chondroitin sulfate. To investigate the origin of these sulfated polysaccharides, the hemolymph was separated into plasma and hemocytes by centrifugation, and the glycans were extracted separately by protease digestion and analyzed by agarose gel electrophoresis. As shown in Fig. 1, the sulfated polysaccharides from the hemolymph have different origins. The material migrating as chondroitin sulfate originates from the plasma, whereas that migrating as heparan sulfate comes from the hemocytes.

The Polysaccharide from the Plasma Is a Sulfated Galactoglucan—The sulfated polysaccharide from plasma was fractionated on an ion exchange column, as described under "Experimental Procedures." Three peaks, denominated P1, P2, and P3, were eluted from the column with different NaCl concentrations (Fig. 2A). P2, which eluted from the column at $\sim 0.8\text{ M}$ NaCl, displayed a homogeneous metachromatic band, migrating as chondroitin sulfate, when analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 2B). P3, which eluted from the column with $\sim 1.2\text{ M}$ NaCl, showed two metachromatic bands (Fig. 2B). The higher mobility band in P3 represents the chondroitin sulfate-migrating material from P2, which is contaminated with a lower mobility band, corresponding to the heparan sulfate-migrating material from hemocytes.

TABLE 1
Chemical composition of the sulfated polysaccharide from *S. plicata* hemolymph

Fraction	Molar ratio		
	Glc	Gal	Sulfate/total sugar
P2	0.61	0.39	1.0

TABLE 2
Proton chemical shifts (ppm) of the sulfated galactoglycan

	Proton chemical shifts ^a					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
α -Anomeric	5.31	3.79	3.97/3.56	4.46	3.56/3.97	3.78
β -Anomeric	4.62	3.79	3.97/3.56	4.46	3.56/3.97	3.78

^a Data obtained from one- and two-dimensional spectra described in Fig. 3, B and C (supplemental material).

In order to obtain information about the plasma polysaccharide, the purified polymer obtained from the ion exchange column (P2) was incubated with chondroitinase AC- and ABC-lyase or treated with nitrous acid, and the products were analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 2C). The plasma polysaccharide resisted the incubations with chondroitin sulfate lyases and the nitrous acid treatment, indicating that it is not chondroitin/dermatan sulfate or heparan sulfate/heparin.

To estimate the size of the plasma polysaccharide, P2 was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, where its migration was compared with those of known molecular weight standard glycans. As shown in Fig. 2D, P2 migrated slightly behind dextran 8,000 (average M_r 8,000), which suggests an average molecular weight of $\sim 10,000$.

The chemical analysis of the plasma polysaccharide was carried out by paper chromatography on two different buffer systems after acid hydrolysis of the purified polymer (P2). As indicated by the chromatographic analysis on butanol/pyridine/water, the polymer is composed mainly by glucose (60%), followed by galactose (40%). No amino sugar or hexuronic acid was detected (Fig. 3, Table 1) as indicated by the chromatographic analysis on isobutyric acid/ NH_4 . High amounts of sulfate ester, in equimolecular proportions with hexoses, were also detected (Table 1). Structural analysis by one-dimensional (Fig. 3B) and two-dimensional (supplemental Fig. 3C) NMR supports the chromatographic data. Clearly, the one-dimensional ^1H NMR spectrum revealed intensity signals of anomeric protons in a proportion of 4:6 for α - and β -forms, respectively (Fig. 3B). This proportion is coincident to the galactose/glucose ratio shown in Table 1 and indicates that the sulfated galactoglucan is composed mainly by α -galactopyranose and β -glucopyranose residues. The COSY spectrum revealed the presence of six connected protons through scalar coupling (cross-peaks), confirming that this compound is a hexose polymer (supplemental Fig. 3C). No evidence of amino or other complex sugars were detected, discarding the possibility of a minor glycosaminoglycan contaminant. Both α - and β -H1 revealed cross-peaks with H2 at $\sim 3.8\text{ ppm}$, suggesting the same assignment (Table 2). This similarity derives from the equal proton chemical shift of galactose and glucose, which are just C4 epimers. Moreover, the H2 high field resonance certainly indicates that there is no

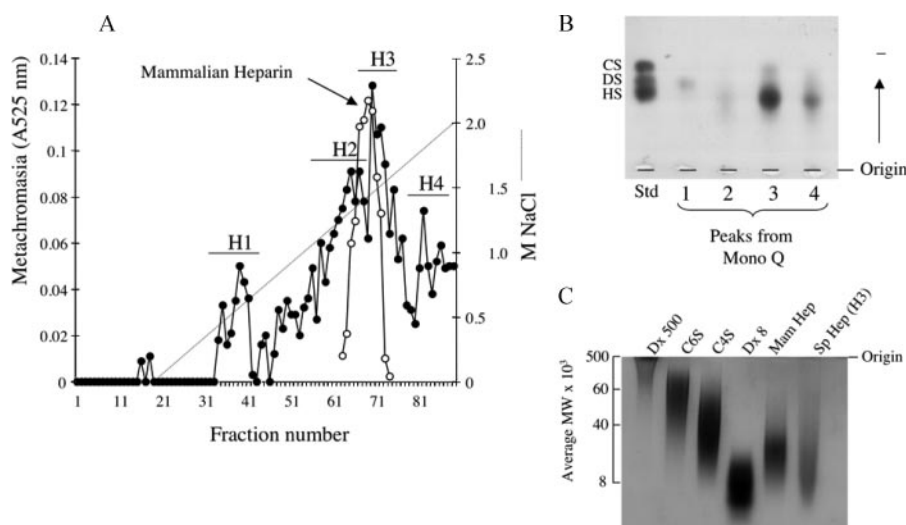


FIGURE 4. Isolation and characterization of the sulfated glycan from hemocytes. *A*, about 2 mg of the sulfated glycan from hemocyte (●) or mammalian heparin (○) (~1 mg) were applied to a Mono Q-FPLC column as described under "Experimental Procedures." Fractions were assayed for metachromasia and NaCl (-----) concentration. *B*, fractions under the peaks denominated H1, H2, H3, and H4 were pooled, dialyzed against distilled water, lyophilized, and analyzed by agarose gel electrophoresis, as described in the legend to Fig. 1. *C*, the purified glycan from hemocyte (*Sp Hep* (H3); ~10 μg dry weight) and the molecular weight markers dextran 500 (*Dx 500*), chondroitin 4-sulfate (*C4S*), chondroitin 6-sulfate (*C6S*), dextran 8 (*Dx 8*), and mammalian heparin (*Man Hep*) (~10 μg as dry weight of each) were applied to a 1-mm-thick 6% polyacrylamide slab gel, as described under "Experimental Procedures." *Std*, standard.

and H4, at different NaCl concentrations (Fig. 4*A*). H1 and H2 contain very little material (Fig. 4*B*) and were discarded. H3, eluted at approximately the same NaCl concentration required to elute porcine intestinal mucosa heparin (~1.5 M) (Fig. 4*A*). When analyzed by agarose gel electrophoresis, H3 shows a single metachromatic band migrating as heparan sulfate standard (Fig. 4*B*). A small amount of this material was eluted at a higher NaCl concentration (H4 in Fig. 4, *A* and *B*).

An estimate of the molecular weight of the purified hemocyte glycan (H3) was carried out by polyacrylamide gel electrophoresis, where its migration was compared with those of known molecular weight standard GAGs. As shown in Fig. 4*C*, H3 migrated slightly ahead of porcine intestinal mucosa heparin, which suggests an average molecular weight of ~12,000 (Fig. 2*D*).

In order to obtain information about the nature of the hemocyte glycan, the purified polymer from the ion exchange column (H3) was incubated with chondroitinase AC-/ABC-lyase and heparin-/heparan sulfate-lyase, and the products were analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 5*A*). The hemocyte glycan was resistant to the action of chondroitin AC/ABC lyases as well as heparan sulfate lyase but was almost totally degraded by heparin lyase, indicating that this is a heparin-like GAG. CTA-SAX HPLC analysis of the products formed by the action of heparin-lyase (I, II, and III) on H3 revealed that the hemocyte heparin is formed mainly by the disaccharides $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$ (39.7%) and $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(\text{6SO}_4)$ (38.2%). Smaller amounts of the disaccharides $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)\text{-}(3\text{SO}_4)(\text{6SO}_4)$ (3.8%) and $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(\text{3SO}_4)$ (9.8%) were also present (Fig. 5*B*, Table 3).

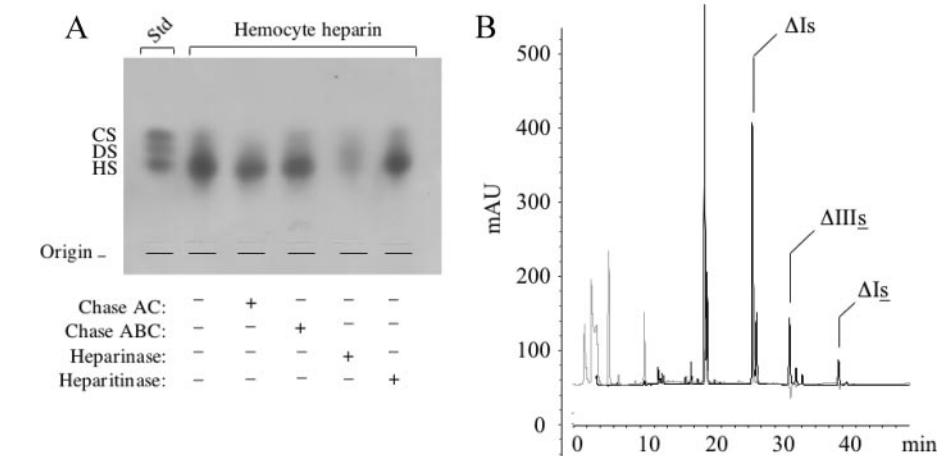


FIGURE 5. Characterization of the hemocyte heparin. *A*, the purified hemocyte heparin (~1.5 μg as uronic acid) and a mixture of standard (*Std*) chondroitin sulfate (*CS*), dermatan sulfate (*DS*), and heparan sulfate (*HS*) were analyzed by agarose gel electrophoresis, before (–) or after (+) incubation with chondroitin AC (*Chase AC*) or ABC (*Chase ABC*) lyases or heparin or heparan sulfate lyases, as described under "Experimental Procedures." *B*, the disaccharides formed by exhaustive action of heparinase I, II, and III) on the hemocyte heparin were applied to a CTA-SAX HPLC column. The column was eluted with a gradient of NaCl as described under "Experimental Procedures." The eluant was monitored for UV absorbance at 232 (black line) and 202–247 (gray line) nm. The assigned peaks correspond to the disaccharides: ΔIIs , $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$; ΔIs , $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(\text{6SO}_4)$; ΔIIs , $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(\text{3SO}_4)(\text{6SO}_4)$; ΔIIIIs , $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(\text{3SO}_4)$.

2-sulfation in this compound. The low field resonance at 4.45 ppm for H4 suggests 4-sulfated and/or 4-linked units.

The Hemocytes of S. plicata Contain a Heparin-like Glycosaminoglycan—The sulfated glycans extracted from hemocytes were fractionated on an ion exchange column, as described under "Experimental Procedures." The glycans were eluted in four metachromatic peaks, denominated H1, H2, H3,

1→4-β-D-GlcN(SO₄)(3SO₄) (9.8%) were also present (Fig. 5*B*, Table 3).

The disaccharide $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)\text{-}(3\text{SO}_4)(\text{6SO}_4)$ was already identified in depolymerized porcine mucosa heparin (41). The $\Delta\text{UA}(\text{2SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)\text{-}(3\text{SO}_4)$ tentative structure was attributed according to several analytical indications; the UV maximum at 232 nm is charac-

teristic of the hexuronic acid bearing 2-*O*-sulfate, and the selective detection signal at 202–247 nm shows an absence of *N*-acetyl and a characteristic minimum of absorbance due to the presence of 3-*O*-sulfated moiety (for a complete method description, see also Ref. 41). The liquid chromatography-mass spectrometry experiment assigns a molecular mass of 577 Da (data not shown). Thus, the chromatographic retention is

clearly not compatible with the only other possible alternative structure, $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$. Therefore, the disaccharide structure is unequivocally attributed to $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$. The presence of high levels of 3-*O*-sulfation on the glucosamine may explain the partial resistance of the hemocyte heparin to heparinase digestion observed in Fig. 3A.

TABLE 3
Disaccharide composition of ascidian and mammalian heparins

Disaccharide	Percentage of the disaccharides		
	Test cell ^a	Granule cell ^b	PIH ^{a,c}
	%	%	%
$\Delta\text{UA-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(6\text{SO}_4)$	<1	1.4	<5
$\Delta\text{UA-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$	25	2	9–11
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$	<1	39.7	6–8
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$	75	38.2	60–70
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$	<1	9.8	<1
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$	<1	3.8	<1

^a Cavalcante *et al.* (28).

^b This work.

^c Porcine intestinal heparin (C. M. de Barros, L. R. Andrade, S. Allodi, C. Viskov, P. A. Mourier, M. C. M. Cavalcante, A. H. Straus, H. K. Takahashi, V. H. Pomin, V. F. Carvalho, M. A. Martins, and M. S. G. Pávao, unpublished data).

The affinity chromatography of the hemocyte glycan demonstrates that both disaccharide $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$ and $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)\text{-}(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ are responsible for the affinity of the polymer for ATIII. 10 mg of hemocyte heparin were chromatographed on ATIII-Sephrose (see “Experimental Procedures”), and the low affinity fraction, which represents about 60% of the heparin chains, was eluted out of the column at 0.25 M NaCl and was desalted on Sephadex G10. This polysaccharide fraction was digested with heparin-lyases (I, II, and III) and analyzed by CTA-SAX HPLC (Fig. 6B).

The high affinity fraction, which accounts for 40% of the heparin chains, was eluted out of the ATIII-Sephrose at 3 M NaCl and was desalted on Sephadex G10. This fraction of the hemocyte glycan was digested with heparin-lyases (I, II, III) and analyzed by CTA-SAX HPLC (Fig. 6C).

In the chromatogram shown in Fig. 6B, it appears clearly that the low affinity fraction of the polysaccharide is basically composed by the disaccharides $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$ and $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$. The two 3-*O*-sulfated disaccharides are nearly absent in this part of the hemocyte heparin. On the contrary, the presence of the 3-*O*-sulfated disaccharides is greatly enhanced in the high affinity fraction of the polymer with respect to hemocyte heparin prior to fractionation (Fig. 6C). Table 4 summarizes these results, and the data clearly demonstrate the key involvement of $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$ and $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)\text{-}(3\text{SO}_4)$ in the ATIII affinity of the polymer. However, the presence of a high affinity pentasaccharide-like binding sequence in the hemocyte heparin remains to be identified and demonstrated in further work.

Hemocyte Heparin Contains Antithrombin Activity—Antithrombin-mediated anticoagulant activity is a specific pharmacological characteristic of heparins. In order to investigate if the hemocyte heparin also

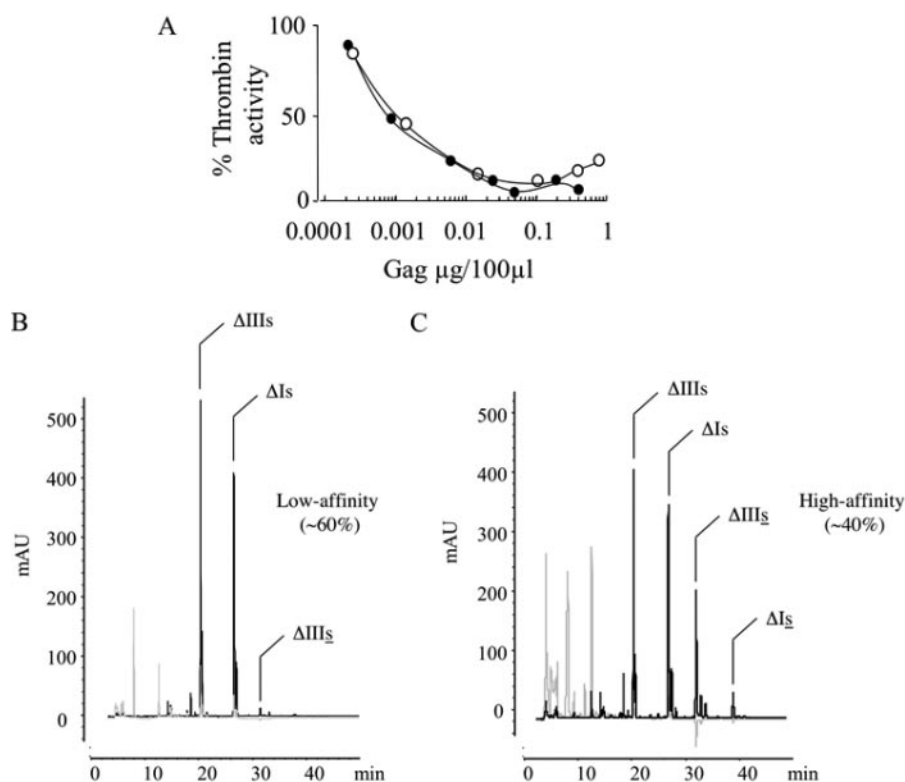


FIGURE 6. Antithrombin activity of the hemocyte heparin and disaccharide analysis of low and high affinity antithrombin fractions. A, antithrombin activity. Shown is inhibition of thrombin activity in the presence of hemocyte (●) or mammalian (○) heparin. Antithrombin (50 nM) was incubated with thrombin (15 nM) in the presence of various concentrations of heparins. After 60 s, the remaining thrombin activity was determined with a chromogenic substrate as described under “Experimental Procedures.” B and C, disaccharide composition. The purified hemocyte heparin (10 mg) was chromatographed on an ATIII-Sephrose column (40 × 5 cm). The polysaccharide fraction was eluted by NaCl solution as described under “Experimental Procedures.” Low affinity (B) and high affinity (C) fractions were eluted with 0.25 and 3 M NaCl, respectively. These fractions were exhaustively digested with a mixture of heparinase I, II, and III and applied to a CTA-SAX HPLC column as described under “Experimental Procedures.” The eluant was monitored for UV absorbance at 232 (black line) and 202–247 nm (gray line). ΔIIs , $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$; ΔIs , $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$; ΔI5 , $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$; ΔIII5 , $\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-}1\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$.

TABLE 4

Disaccharide composition of the low and high antithrombin III affinity fractions of the hemocyte heparin

Disaccharide	Percentage of the disaccharides		
	Hemocyte heparin	Low affinity fraction	High affinity fraction
	%	%	%
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)$	39.7	42.5	33
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$	38.2	45.1	33.5
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)(6\text{SO}_4)$	3.8	0.6	4.2
$\Delta\text{UA}(2\text{SO}_4)\text{-1}\rightarrow\text{4-}\beta\text{-D-GlcN}(\text{SO}_4)(3\text{SO}_4)$	9.8	1.4	21.2
Sum of other minor saccharides	8.5	10.4	9.1

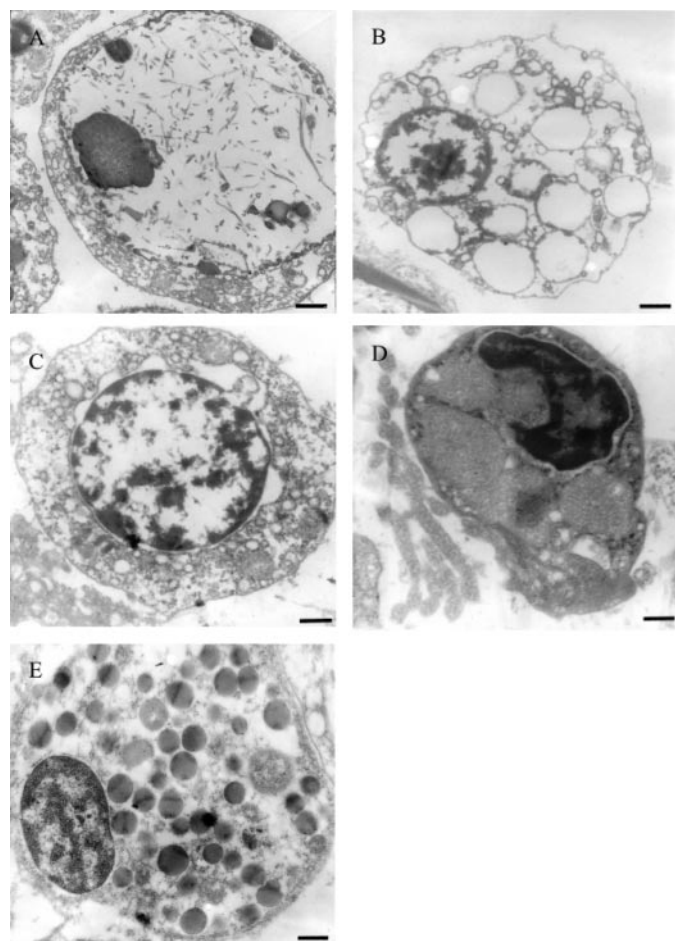


FIGURE 7. Conventional transmission electron micrographs showing the ultrastructural features of *S. plicata* hemocytes. A, univacuolated cell (bar, 0.68 μm). B, multivacuolated cell (bar, 0.66 μm). C, hemoblast or lymphocyte-like cell (bar, 0.66 μm). D, amebocyte (bar, 0.36 μm). E, granulocyte cell (bar, 0.50 μm).

possesses this activity, we measured the inhibition of thrombin by antithrombin in the presence of increasing concentrations of invertebrate or mammalian GAG (Fig. 6A). The rate of thrombin inhibition by antithrombin induced by the hemocyte heparin was similar to that induced by porcine intestinal mucosa heparin, indicating that both mammalian and invertebrate heparins have the same anticoagulant activity.

S. plicata Hemolymph Contains Different Types of Hemocytes—Different types of cells occur in *S. plicata* hemocyte population. Transmission electron microscopy observations revealed that the hemolymph of this ascidian has at least five recognizable cell types. Fig. 7A shows an univacuolated cell type (5.5–9.5 μm in diameter) containing a huge vacuole that occu-

pies almost the whole volume of the cytoplasm. Dispersed fibrillar material and electron-lucent round vesicles are present within the vacuole. Some of the smaller electron-dense vesicles are seen close to the membrane that surrounds the vacuole with an aspect that suggests a sprouting from the membranes.

A multivacuolated cell type is shown in Fig. 7B. This 6.5–8.0- μm cell has a spherical shape and contains 2–20 regularly sized electron-lucent vacuoles close to small vesicles. Its nucleus is very evident, including the chromatin arrangement.

Another cell type is shown in Fig. 7C. It resembles hemoblasts or lymphocyte-like cells described by others in ascidians (31, 32, 34). This 4.0–5.5- μm cell has small vesicles, sometimes continuous with the nuclear envelope and mitochondria profiles.

Fig. 7D shows the smallest cell type (2.5–5.0- μm diameter). It has a dense cytoplasm with small vesicles, large mitochondria profiles, and a nucleus that occupies most of the cell. This cell has similar characteristics to the cell type named amebocyte by Fuke and Fukumoto (50).

Finally, Fig. 7E shows the granulocyte cell with a 3.5–6.0- μm diameter. Many granules or vesicles containing a material with varying electron densities can be observed intracellularly. The granules are uniform in the sense that most of them are spherical and with comparable sizes ($\sim 0.4 \mu\text{m}$).

Heparin Is Restricted to Only One Type of Hemocyte—In order to identify which cells contain heparin, a preparation of the hemocytes was immunogold-labeled with anti-heparin antibody. As shown in Fig. 8, 10-nm gold particles were observed in only one type of cell, named the granulocyte cell. The gold particles associated with the anti-heparin (Fig. 8B) antibody were localized inside electron-dense granules.

In mammals, histamine is associated with heparin in the granules of mast cells and basophils. In the present work, 10-nm gold particles were observed within intracellular granules of ascidian granulocytes (Fig. 8C) and rat peritoneal mast cells (Fig. 8, D and E) after immunogold labeling with anti-histamine antibody. The pattern of gold labeling is very similar to that observed when anti-heparin antibody was used. No significant labeling was observed in other regions of the granulocytes or in other hemocytes or in rat peritoneal mast cell when primary antibody was omitted.

In a previous study (20), histamine was detected in the intestine and pharynx of *S. plicata*, using immunolabeling with anti-histamine antibody. To confirm the presence of histamine in these tissues and also the results of the immunogold labeling described in the present work, the activity of the enzyme histamine *N*-methyltransferase was measured in homogenates of intestine, pharynx, and hemolymph of *S. plicata* as well as in

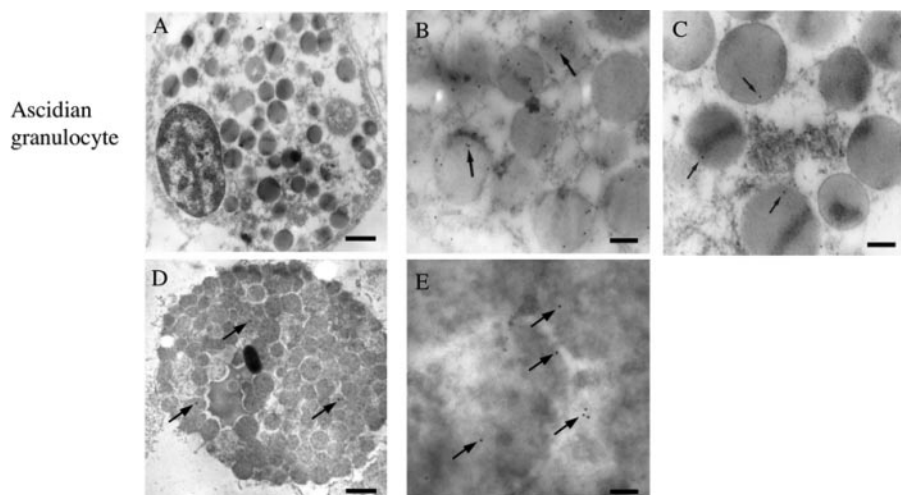


FIGURE 8. Immunolocalization of heparin and histamine in the granulocyte cell. Electron micrograph showing the pattern of gold labeling associated with anti-heparin (*mAb 5T-1*) and anti-histamine antibodies in the ascidian granulocyte (B and C) and rat peritoneal mast cell (D and E). A, granule cell (bar, 0.50 μm). B, gold labeling associated with anti-heparin antibody (bar, 0.22 μm). C, gold labeling associated with anti-histamine antibody (bar, 0.22 μm). D and E, gold labeling associated with anti-histamine antibody. Bar, 0.73 μm (D) and 0.083 μm (E). Arrows, gold particles.

TABLE 5

Histamine content in the hemolymph and in different tissues of *S. plicata*

Tissue	Histamine content ^a
	ng/mg protein
Hemolymph	7.18 \pm 0.75
Pharynx	56.02 \pm 3.43
Intestine	48.43 \pm 5.45

^a Histamine content was estimated by measuring the activity of the enzyme histamine-*N*-methyltransferase, as described under "Experimental Procedures."

homogenates of rat peritoneal mast cells. As shown in Table 5, significant levels of histamine, estimated by the activity of histidine *N*-methyltransferase, were detected in all of the samples analyzed. Histamine content was higher in intestine and pharynx. This result provides a biochemical evidence of the presence of histamine in the granulocyte and in the intestine and pharynx of the ascidian.

DISCUSSION

In the present paper, we described the purification and characterization of two sulfated glycans from the hemolymph of *S. plicata*: a sulfated galactoglucan and a heparin glycosaminoglycan. In addition, electron microscopy techniques were used to characterize the ultrastructure of the hemocytes and to localize heparin and histamine in these cells.

The hemolymph of ascidians is composed of different types of cells, named hemocytes, and a liquid plasma. Several proteins have been described as occurring in the plasma hemolymph, such as serine protease inhibitors (51), serine proteases (52), metalloproteinases (53), phenoloxidase (54), trypsin inhibitors (55), trypsin (56), hemocyte aggregation factor (57), and different types of lectins (58–60). Although other sulfated polysaccharides have been described in the tunic of different species of ascidians, including *S. plicata* (61, 62), according to our knowledge, the occurrence of a free sulfated polysaccharide in the plasma is reported here for the first time.

It is interesting to note that the chemical composition of the sulfated glycans in ascidians varies according to the tissue and stage of development. For example, in adult tunic, the main polysaccharide is a high molecular weight sulfated galactan, composed by α -L-galactopyranose residues sulfated at position 3 and linked through positions 1 \rightarrow 4 (62, 63). This polymer is synthesized by epidermal cells that epimerize D-glucose, possibly from a trehalose precursor, into L-galactose (64, 65). The larval tunic, on the other hand, possesses a heteropolysaccharide composed mainly of glucose and sulfated fucose, with minor amounts of L-galactose (66). The hemolymph polysaccharide reported in the present study is a low molecular weight sulfated

galactoglucan, which has a higher sulfate content (1.0 mol of sulfate/mol of hexose) when compared with adult (0.7 mol of sulfate/mol of hexose) (62) and larval (0.4 mol of sulfate/mol of hexose) tunic (66) glycans. The enantiomeric form of galactose and the position of sulfation of the hemolymph polysaccharide are under investigation. Sulfated GAGs do not occur in the tunic but abound in different organs of ascidians (64, 67). An oversulfated dermatan sulfate composed of IdoA(2SO₄)-GalNAc(4SO₄) disaccharide units and a low sulfated heparin have been reported in the intestine, heart, pharynx, and mantle of the ascidian *S. plicata* (68, 69). Moreover, a dermatan sulfate with the unique disaccharide unit IdoA(2SO₄)-GalNAc(6SO₄) was isolated from the body of the ascidian *Phallusia nigra* (70, 71).

Previously, we reported the occurrence of heparin, composed of the disaccharides Δ UA(2SO₄)-GlcN(SO₄)(6SO₄) (75%) and Δ UA-4-GlcN(SO₄)(6SO₄) (25%), in intracellular granules of test cells of *S. plicata* (28). Now we report in the hemolymph of this ascidian a heparin with a different composition, formed by approximately equal amounts of the disulfated disaccharide Δ UA(2SO₄)-GlcN(SO₄) and the trisulfated disaccharide Δ UA(2SO₄)-GlcN(SO₄)(6SO₄). Smaller quantities of tri- and tetrasulfated disaccharides, containing 3-*O*-sulfated glucosamine, which is required for binding to antithrombin, were also found (72, 73). Overall, these results suggest that the enzymes of the synthesis of heparin in *S. plicata* are either differently regulated or differ in the test cells and hemocytes.

Because of heparin's unique binding to antithrombin, involving the specific pentasaccharide sequence GlcNAc(6SO₄)-GlcA-GlcNS(3SO₄)-IdoA(2SO₄)-GlcNS(6SO₄), which contains a unique 3-*O*-sulfated glucosamine, mammalian heparin is endowed with a potent anticoagulant activity (74, 75). Analysis of the anticoagulant action of the hemocyte heparin revealed an antithrombin activity 10-fold higher than that of test cell heparin and similar to that observed in mammalian heparin (porcine intestinal mucosa). These results are in agree-

ment with the presence of significant amounts of 3-*O*-sulfated glucosamine residues in the hemocyte heparin, not detected in test cell heparin (28), that could form a pentasaccharide-like sequence with high affinity to antithrombin.

Important data about the morphology of *S. plicata* hemocytes were revealed by conventional transmission electron microscopy. According to our observations, five types of circulating hemocytes were described: univacuolated and multivacuolated cells, amebocytes, hemoblasts, and granulocytes. Different from our results, Radford *et al.* (32) described eight individual hemocyte types in the ascidian *S. plicata*. This may be due to the different methodology employed in that work, which was based mainly on bright field optical microscopy and cell sorting performed on immunofluorescently stained hemocytes.

The identification of a granulocyte in the hemolymph of *S. plicata*, morphologically related to vertebrate basophils, was of notice. In the granules of the ascidian granulocyte, a central electron-dense region can be observed. Granules with an electron-dense core are present mainly in granulocytes of higher vertebrates, such as reptiles and mammals (76–78), whereas granules with no electron-dense core have been reported in more primitive vertebrate granulocytes, such as fish and bufonid.

In addition to morphological similarities, *S. plicata* granulocyte also contains biochemical characteristics common to vertebrate basophils, such as intracellular GAG, in this case heparin and histamine. Mammalian heparin is synthesized onto a specific protein core, forming the serglycin PGs (5–9). These PGs are resistant to proteolytic degradation (5, 79). In the present work, peptide-free heparin chains were obtained after proteolytic degradation of the hemocytes, suggesting that the granulocyte heparin is probably linked to a core protein different from that of serglycin PGs.

Histamine was unequivocally detected in the intestine and pharynx of *S. plicata* and in the hemolymph by measuring the activity of the enzyme histidine *N*-methyltransferase, which is involved in the catabolism of histamine. We also estimated the content of histamine in rat peritoneal mast cells using this method (~13 pg/cell). It should be emphasized that the histamine assay we have employed for tissues from *S. plicata* is a sensitive and highly specific method. Its specificity is achieved by employing an enzyme, histamine *N*-methyltransferase, isolated from guinea pig brains, whereas the sensitivity is accounted for by the use of the *S*-adenosyl[methyl-³H]methionine as the radioactive cofactor. As far as we know, it is quite unlikely that histidine *N*-methyltransferase could be using serotonin or dopamine as substrate. The major false positives for histamine found in mammalian tissue samples, mainly concerning fluorimetric assays, are spermine, spermidine, and putrescine. Prior studies have demonstrated that the radioenzymic method for histamine did not mistake the latter for the former as reported (80). This is interesting when analyzing within the context of the ascidian *Ciona intestinalis* genome, which does not show the presence of a histidine decarboxylase-like gene in the organism. The histidine decarboxylase-like gene codifies an enzyme involved in the biosynthesis of histamine. This raises the possibility that histidine decarboxylase-

like genes reside at nonsequenced sites in the organism's genome.

The results presented in the present study suggest that the hemolymph granulocyte may be a primitive counterpart of mammalian basophil, involved in immunological mechanisms, especially when migrating from the blood vessels to perform activities such as encapsulation, phagocytosis, liberation of microbial peptides, triggering of the complement system, and regeneration of tissues.

Acknowledgment—We thank Claudia Du Bocage Santos-Pinto for technical assistance.

REFERENCES

- Rodén, L. (1980) in *Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (Lennarz, W. J., ed) pp. 267–371, Plenum Press, New York
- Conrad, H. E. (1998) *Heparin-binding Proteins*, Academic Press, Inc., San Diego
- Casu, B., and Lindahl, U. (2001) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **57**, 159–206
- Powell, A. K., Yates, E. A., Fernig, D. G., and Turnbull, J. E. (2004) *Glycobiology* **14**, 17R–30R
- Yurt, R. W., Leid, R. W., Jr., and Austen, K. F. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 518–521
- Robinson, H. C., Horner, A. A., Hook, M., Ogren, S., and Lindahl, U. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6687–6693
- Metcalfe, D. D., Lewis, R. A., Silbert, J. E., Rosenberg, R. D., Wasserman, S. I., and Austen, K. F. J. (1979) *J. Clin. Invest.* **64**, 1537–1543
- Metcalfe, D. D., Smith, J. A., Austen, K. F., and Silbert, J. E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11753–11758
- Bland, C. E., Ginsburg, H., Silbert, J. E., and Metcalfe, D. D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8661–8666
- Yurt, R. W., Leid, R. W., Jr., Spragg, J., and Austen, K. F. (1977) *J. Immunol.* **118**, 1201–1207
- Schwartz, L. B., Riedel, C., Caulfield, J. P., Wasserman, S. I., and Austen, K. F. (1981) *J. Immunol.* **126**, 2071–2078
- MacDermott, R. P., Schmidt, R. E., Caulfield, J. P., Hein, A., Bartley, G. T., Ritz, J., Schlossman, S. F., Austen, K. F., and Stevens, R. L. (1985) *J. Exp. Med.* **162**, 1771–1787
- Razin, E., Stevens, R. L., Akiyama, F., Schmid, K., and Austen, K. F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7229–7236
- Nakano, T., Sonoda, T., Hayashi, C., Yamatodani, A., Kanayama, Y., Yamamura, T., Asai, H., Yonezawa, T., Kitamura, Y., and Galli, S. J. (1985) *J. Exp. Med.* **162**, 1025–1043
- Wedemeyer, J., Tsai, M., and Galli, S. J. (2000) *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 624–631
- Dietrich, C. P., de Paiva, J. F., Moraes, C. T., Takahashi, H. K., Porcionatto, M. A., and Nader, H. B. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **843**, 1–7
- Pejler, G., Danielsson, A., Bjork, I., Lindahl, U., Nader, H. B., and Dietrich, C. P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11413–11421
- Dietrich, C. P., Nader, H. B., de Paiva, J. F., Santos, E. A., Holme, K. R., and Perlin, A. S. (1989) *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 361–366
- Nader, H. B., Chavante, S. F., dos-Santos, E. A., Oliveira, T. W., de-Paiva, J. F., Jeronimo, S. M., Medeiros, G. F., de-Abreu, L. R., Leite, E. L., de-Sousa-Filho, J. F., Castro, R. A., Toma, L., Tersariol, I. L., Porcionatto, M. A., and Dietrich, C. P. (1999) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 529–538
- Arumugam, M., and Shanmugam, A. (2004) *Indian J. Exp. Biol.* **42**, 529–532
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., and Volpi, N. (2004) *Glycobiology* **14**, 1275–1284
- Luppi, E., Cesaretti, M., and Volpi, N. (2005) *Biomacromolecules* **6**, 1672–1678
- Hovingh, P., and Linker, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9840–9844
- Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A., and Nader, H. B. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*

Downloaded from www.jbc.org at CAPES/MEC - UFRJ on January 16, 2009

- 1428, 273–283
25. Chavante, S. F., Santos, E. A., Oliveira, F. W., Guerrini, M., Torri, G., Casu, B., Dietrich, C. P., and Nader, H. B. (2000) *Int. J. Biol. Macromol.* **27**, 49–57
 26. Tirumalai, R., and Subramoniam, T. (2001) *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 54–62
 27. Demir, M., Iqbal, O., Dietrich, C. P., Hoppensteadt, D. A., Ahmad, S., Daud, A. N., and Fareed, J. (2001) *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **7**, 44–52
 28. Cavalcante, M. C., Allodi, S., Valente, A. P., Straus, A. H., Takahashi, H. K., Mourão, P. A., and Pavão, M. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36189–36196
 29. Cavalcante, M. C., Andrade, L. R., Du Bocage Santos-Pinto, C., Straus, A. H., Takahashi, H. K., Allodi, S., and Pavão, M. S. (2002) *J. Struct. Biol.* **137**, 313–321
 30. Pavão, M. S. (2002) *An. Acad. Bras. Cienc.* **74**, 105–112
 31. Sawada, T., Zhang, J., and Cooper, E. L. (1993) *Biol. Bull.* **184**, 87–96
 32. Radford, J. L., Hutchinson, A. E., Burandt, M., and Raftos, D. A. (1998) *Acta Zool.* **79**, 44–49
 33. Menzel, L. P., Lee, I. H., Sjostrand, B., and Lehrer, R. I. (2002) *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 505–515
 34. Hirose, E., Shirae, M., and Saito, Y. (2003) *Zoolog. Sci.* **20**, 647–656
 35. Hirose, E. (2003) *Zoolog. Sci.* **20**, 387–394
 36. Cardoso, L. E., and Mourão, P. A. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 509–514
 37. Brown, D. D., Tomchick, R., and Axelrod, J. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2948–2950
 38. Peddie, C. M., and Smith, V. J. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **712**, 332–334
 39. Farndale, R. W., Buttle, D. J., and Barrett, A. J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 173–177
 40. Dietrich, C. P., and Dietrich, S. M. (1976) *Anal. Biochem.* **70**, 645–647
 41. Mourier, P., and Viskov, C. (2004) *Anal. Biochem.* **332**, 299–313
 42. Bitter, T., and Muir, H. M. (1962) *Anal. Biochem.* **4**, 330–334
 43. Shively, J. E., and Conrad, H. E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3932–3942
 44. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* **28**, 350–354
 45. Saito, H., Yamagata, T., and Suzuki, S. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 1536–1542
 46. Straus, A. H., Travassos, L. R., and Takahashi, H. K. (1992) *Anal. Biochem.* **201**, 1–8
 47. Fleury, P., and Eberhard, R. (1951) *Ann. Biol. Clin.* **9**, 453–466
 48. Snyder, S. H., Baldessarini, R. J., and Axelrod, J. (1966) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **153**, 544–549
 49. Correa, F. M. A., and Saavedra, J. M. (1981) *Brain Res.* **205**, 445–451
 50. Fuke, M., and Fukumoto, M. (1993) *Acta Zool.* **74**, 61–71
 51. Shishikura, F., Abe, T., Ohtake, S., and Tanaka, K. (1996) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **114**, 1–9
 52. Shishikura, F., Abe, T., Ohtake, S., and Tanaka, K. (1997) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **118**, 131–141
 53. Azumi, K., and Yokosawa, H. (1996) *Zool. Sci.* **13**, 365–370
 54. Akita, N., and Hoshi, M. (1995) *Cell Struct. Funct.* **20**, 81–87
 55. Kumazaki, T., Hoshiba, N., Yokosawa, H., and Ishii, S. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **107**, 409–413
 56. Yokosawa, H., Odajima, R., and Ishii, S. (1985) *J. Biochem. (Tokyo)* **97**, 1621–1630
 57. Takahashi, H., Azumi, K., and Yokosawa, H. (1995) *Eur. J. Biochem.* **233**, 778–783
 58. Green, P. L., Nair, S. V., and Raftos, D. A. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 3–9
 59. Pearce, S., Newton, R. A., Nair, S. V., and Raftos, D. A. (2001) *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 377–385
 60. Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., and Fujita, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19959–19965
 61. Pavão, M. S., Albano, R. M., and Mourão, P. A. S. (1989) *Carbohydr. Res.* **189**, 374–379
 62. Pavão, M. S., Albano, R. M., Lawson, A. M., and Mourão, P. A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9972–9979
 63. Pavão, M. S., Mourão, P. A., and Mulloy, B. (1990) *Carbohydr. Res.* **208**, 153–161
 64. Pavão, M. S., Rodrigues, M. A., and Mourão, P. A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1199**, 229–237
 65. Mourão, P. A., and Assreuy, A. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 3132–3140
 66. Pavão, M. S. G., Lambert, C. C., Lambert, G., and Mourão, P. A. S. (1994) *J. Exp. Zool.* **269**, 89–94
 67. Pavão, M. S. (1996) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 1227–1233
 68. Pavão, M. S., Aiello, K. R., Werneck, C. C., Silva, L. C., Valente, A. P., Mulloy, B., Colwell, N. S., Tollefsen, D. M., and Mourão, P. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27848–27857
 69. Gandra, M., Cavalcante, M., and Pavão, M. S. (2000) *Glycobiology* **10**, 1333–1340
 70. Pavão, M. S., Mourão, P. A., Mulloy, B., and Tollefsen, D. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31027–31036
 71. Mourão, P. A., Pavão, M. S., Mulloy, B., and Wait, R. (1997) *Carbohydr. Res.* **300**, 315–321
 72. Lindahl, U., Backstrom, G., Thunberg, L., and Leder, I. G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6551–6555
 73. Petitou, M., Casu, B., and Lindahl, U. (2003) *Biochimie (Paris)* **85**, 83–89
 74. Lane, D. A., and Lindahl, U. (1989) *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
 75. Lindahl, U., Lidholt, K., Spillmann, D., and Kjellen, L. (1994) *Thromb. Res.* **75**, 1–32
 76. Martinez-Silvestre, A., Rodriguez-Dominguez, M. A., Mateo, J. A., Pastor, J., Marco, I., Lavin, S., and Cuenca, R. (2004) *Vet. Rec.* **155**, 266–269
 77. Martinez-Silvestre, A., Marco, I., Rodriguez-Dominguez, M. A., Lavin, S., and Cuenca, R. (2005) *Res. Vet. Sci.* **78**, 127–134
 78. Zucker-Franklin, D., and Hirsch, J. G. (1964) *J. Exp. Med.* **120**, 569–756
 79. Horner, A. A. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 231–239
 80. Kobayashi, Y., and Maudsley, D. V. (1972) *Anal. Biochem.* **46**, 85–90

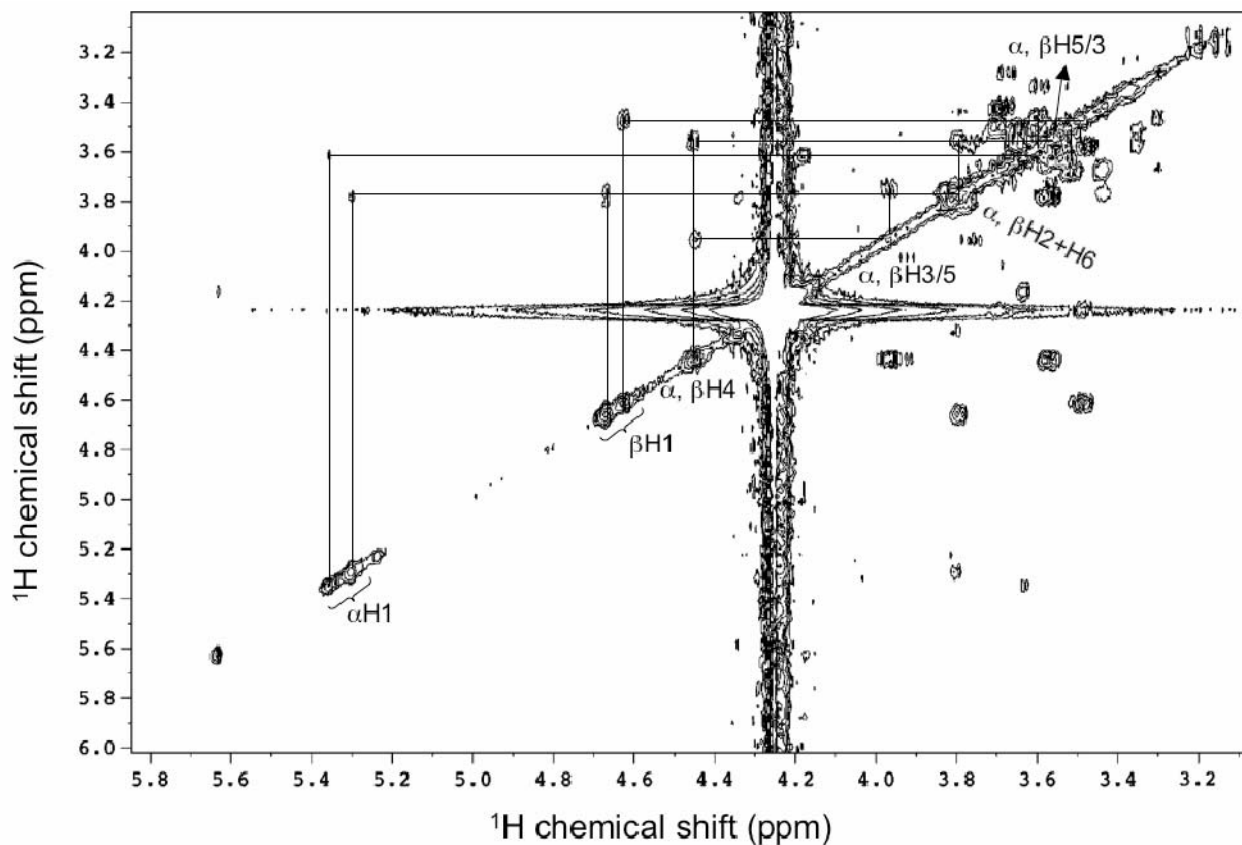


Figure 3 C: *COSY spectrum of the purified sulfated galactoglucan from plasma.* COSY spectrum was recorded using states-TPPI (states-time proportion phase incrementation) for quadrature detection in the indirect dimension. All chemical shifts were relative to external trimethylsilylpropionic acid for ^1H . The correlation spectroscopy (COSY) spectrum revealed the presence of 6 connected protons through scalar coupling (cross-peaks) confirming that this compound is a hexose polymer. No evidence of amino or other complex sugars are shown, discarding the possibility of a minor glycosaminoglycan contaminant.

Elsevier Editorial System(tm) for Fish and Shellfish Immunology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Hemocytes of the ascidian *Styela plicata*: Immune responses mediated by nitric oxide.

Article Type: Full Length Article

Section/Category:

Keywords: ascidian; blood cells; electron microscopy; immunoelectronmicroscopy; inducible nitric oxide synthase.

Corresponding Author: Dr Silvana Allodi, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio de Janeiro

First Author: Cintia M de Barros

Order of Authors: Cintia M de Barros; Danielle R de Carvalho; Leonardo R Andrade, PhD; Mauro S Pavão, PhD; Silvana Allodi, Ph.D.

Manuscript Region of Origin:

Abstract: The ascidian hemolymph contains different types of circulating cells that are believed to be involved, in addition to other functions, in defense and repair mechanisms. Literature analysis indicates that there is no consensus concerning the classification and terminology of these cells. In order to contribute to the nomenclature of the blood cells and to better understand the relationship between morphology and function, we carried out a detailed ultrastructural study of the blood cells of *Styela plicata*. Five types of blood cells could be identified in the hemolymph: granulocytes, hemoblasts, lymphocyte-like cells, morula cells, and pigment cells. Because nitric oxide (NO) is expressed in cells with anti-inflammatory functions, we carried out cytochemical reactions for NO synthase (NOS) to investigate whether blood cells expressed NOS after lipopolysaccharide (LPS)

stimulation. The results showed that lymphocyte-like cells produce the most NO. However, in contrast to vertebrate macrophages, after LPS stimulation, nitrite generation did not differ with varying concentrations or time periods.

January 28th, 2009

To:
Dr. A. E. Ellis
Editor
Fish and Shellfish Immunology

Dear Dr. Ellis,

Please find enclosed the article entitled “Hemocytes of the ascidian *Styela plicata*: Immune responses mediated by nitric oxide” by Cintia Monteiro de Barros, Danielle Ronald de Carvalho, Leonardo R. Andrade, Mauro Sérgio Gonçalves Pavão and Silvana Allodi. The article deals with the morphological aspects of ascidian hemocytes and the possible correlation with functional roles displayed by these cells. This manuscript is also related with the one published by us in 2007 (de Barros, C.M., Andrade, L.R., Allodi, S., Viskov, C., Mourier, P.A., Cavalcante, M.C.M., Straus, A.H., Takahashi, H.K., Pomim, V.H., Carvalho, V.F., Martins, M.A., Pavão, M.S.G. The hemolymph of the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and a unique sulfated galactoglucan in the plasma. *Journal of Biological Chemistry* 282: 1615-1626. DOI 10.1074/jbc.M604056200). We consider that the contents of the present manuscript are in the scope of *Fish and Shellfish Immunology*, as it gives original information on the ascidian hemocytes, besides evaluating the expression of nitric oxide in this system. The results can arouse special interest, since they can lead to considerations on the innate immunity in a species of invertebrate which is phylogenetically close to vertebrates.

I also want to inform that the authors read and approved the manuscript and that the English of the manuscript was totally revised on a professional basis by Dr. Janet Reid - jwrassociates@sitestar.net.

Yours sincerely,

Silvana Allodi
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Ilha do Fundão
21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Telephone; 55 21 2562-6431
Fax: 55 21 25626480
E-mail: sallodi@histo.ufrj.br

Hemocytes of the ascidian *Styela plicata*: Immune responses mediated by nitric oxide

Cintia Monteiro de Barros,^{a,b,d} , Danielle Ronald de Carvalho^d, Leonardo R.

Andrade,^{b,c} Mauro Sérgio G. Pavão^{a,b} and Silvana Allodi^{b,d}

^aLaboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^cLaboratório de Biomineralização, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^dLaboratório de Neuro-histologia e Ultraestrutura, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding author: Silvana Allodi
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Ilha do Fundão, 21941-902
Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
Telephone: + 55 21 25626431
Fax: +55 21 25626480
E-mail: sallodi@histo.ufrj.br

Abstract

The ascidian hemolymph contains different types of circulating cells that are believed to be involved, in addition to other functions, in defense and repair mechanisms. Literature analysis indicates that there is no consensus concerning the classification and terminology of these cells. In order to contribute to the nomenclature of the blood cells and to better understand the relationship between morphology and function, we carried out a detailed ultrastructural study of the blood cells of *Styela plicata*. Five types of blood cells could be identified in the hemolymph: granulocytes, hemoblasts, lymphocyte-like cells, morula cells, and pigment cells. Because nitric oxide (NO) is expressed in cells with anti-inflammatory functions, we carried out cytochemical reactions for NO synthase (NOS) to investigate whether blood cells expressed NOS after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The results showed that lymphocyte-like cells produce the most NO. However, in contrast to vertebrate macrophages, after LPS stimulation, nitrite generation did not differ with varying concentrations or time periods.

Key words: ascidian, blood cells, electron microscopy, immunoelectronmicroscopy, inducible nitric oxide synthase.

Introduction

Ascidians are invertebrates that occupy an interesting phylogenetic position because they are considered a sister-group of vertebrates, classified in the phylum Chordata, subphylum Urochordata. These primitive chordates have been used as model organisms for understanding ancient immunological mechanisms through the study of individual cells, such as blood cells [1]. Blood cells are cells that circulate in the hemolymph and perform a wide variety of functions, such as phagocytosis and recognition of self and non-self molecules, repair of damaged tissues, and induction of blood-cell aggregation to prevent blood-fluid loss [2-5].

Hirose et al. [6] advanced the classification of ascidian blood cells by describing the ultrastructure of blood cells in nine botryllid ascidians. They reported five types of circulating blood cells: hemoblasts, phagocytes, granulocytes, morula cells, and pigment cells. Classifying hemocytes of the ascidian *Styela plicata* by light microscopy, Radford et al. [7] defined eight cell types: hemoblasts, lymphocyte-like cells, signet ring cells, refractile vacuolated cells, non-refractile vacuolated cells, pigment cells, fried-egg cells, and fine granular cells. In a recent preliminary study on hemocytes of *S. plicata*, we reported five cell types: univacuolated and multivacuolated cells, amebocytes, hemoblasts, and granulocytes [8].

A number of other studies have identified hemocytes that migrate from the hemolymph to carry out their physiological role in the tissues [8-11]. In *S. plicata*, heparin and histamine-containing cells were detected in hemolymph, pharynx, and intestinal epithelium [8-10]. In addition, in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*, nitric oxide (NO) has been reported to occur in one type of hemocyte, the morula cell [12]. Analysis of

the genome of *Ciona intestinalis* confirmed the occurrence of the NO synthase (NOS) gene in ascidians; however, in contrast to the mammalian genome in which three distinct genes are present [13,14], in *C. intestinalis* only one NOS gene was detected [15].

To contribute to the nomenclature of hemocytes and to better understand the relationship between morphology and physiology, we carried out a detailed ultrastructural study of the hemocytes of *S. plicata*. We also used cytochemical and immunocytochemical techniques to investigate molecular mechanisms involved in the synthesis of NOS in this ascidian.

Materials and Methods

1. Collection of tunicates

Adult individuals of *S. plicata* were collected at Urca Beach in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil, transferred in local water in insulated plastic boxes, and maintained in an aerated aquarium containing filtered seawater at 20°C until use.

2. Hemocytes

2.1 Isolation of the hemocytes

The hemolymph from three individuals of *S. plicata* was harvested from the coelomic cavity near the heart with a syringe containing the marine anticoagulant (MAC = 0.45 M NaCl, 100 mM glucose, 1.5 mM trisodium citrate, 13 mM citric acid, 10 mM EDTA in 1 L distilled water, pH 7.0) [16], after removing a fragment of the tunic and exposing the mantle. Then, the hemolymph was transferred to test tubes containing equal volumes of MAC, and the hemocytes were separated from the plasma by centrifugation for

5 min at 130 X g, at room temperature. The pellets containing the hemocytes were fixed for either conventional transmission electron microscopy (TEM) or immunoelectronmicroscopy.

3. Light microscopy

To detect the presence of NOS in hemocytes, the cells were harvested as described above and adhered to coverslips for 30 min in MAC, fixed with 4% formaldehyde freshly prepared from paraformaldehyde powder and diluted in artificial sea water (ASW), immersed in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 4 h at 4°C, and reacted with NADPH-diaphorase with nitro blue tetrazolium (NBT) as a chromogen. For comparison, hemocytes were also stained with hematoxylin and eosin (H-E). Hemocytes stimulated with 100 µg of lipopolysaccharides (LPS) for 1 h were also reacted for NADPH-diaphorase with NBT. Hemocytes prepared in the same way were also observed after a reaction using a primary antibody against NFκB p65 (F-6) (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) and as a secondary antibody, an anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Eugene, OR, U.S.A.) used at a 1/600 dilution.

The pharynx and the tunic were dissected from the ascidians and fixed with 4% paraformaldehyde in ASW for the same period as described above for hemocytes. The pharynx was embedded in OCT (Tissue-Tek, Sakura, Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and sectioned using a Leica cryostat (10 µm thickness). The pharynx and tunic of other ascidians were dehydrated in an ethanol graded series until absolute, and embedded in paraffin wax. Semithin (5 µm) sections were obtained using a microtome (Sorval) and stained with H-E for 5 min. The sections were observed under a Zeiss Axioplan light

microscope equipped with a CCD color camera (Media Cybernetics, model Evolution™ MP), and digital images were obtained.

In order to determine whether the hemocytes present in the pharynx and tunic expressed NOS, we used the NADPH-diaphorase technique for the pharynx frozen sections, and iNOS immunohistochemistry for the pharynx and tunic paraffin sections. The primary antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), developed in rabbit against C-terminus of iNOS of mouse macrophage, was used at a dilution of 1/1000. The secondary antibody was a biotinylated anti-mouse IgG made in goat (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) used at a dilution of 1/600. The antibody against NFκB p65 (F-6) (Santa-Cruz), developed in mouse against N-terminus of NFκB p65 of human origin, was used in paraffin sections of tunic tissue at a 1/50 dilution. The secondary antibody was anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes), used at a 1/600 dilution.

4. Conventional transmission electron microscopy

The pellets containing hemocytes were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) diluted in ASW, under microwaves (Laboratory Microwaves Processor, Pelco Model RFS59MP, 2.45 GHz) for 10 sec twice at 45°C, and rinsed twice in the same buffer for 15 min at room temperature. The samples were post-fixed in buffered 1% osmium tetroxide (pH 7.3) in a microwave oven for 10 sec, dehydrated through a graded acetone series, and embedded in the epoxy resin Poly/Bed 812 (Polyscience, Inc.). After polymerization in pure resin, the resulting blocks were cut, using a RMC-MT 6000-XL ultramicrotome. Semithin sections (500 nm) were stained with toluidine blue and observed under the light microscope to evaluate fixation.

Ultrathin sections (70 nm) were further collected on copper grids (300 mesh). The sections were stained with 2% uranyl acetate for 20 min and 1% lead citrate for 3 min. The samples were observed under a Jeol 1200 EX transmission electron microscope, operated at 80 kV.

5. Immunoelectronmicroscopy

Circulating hemocytes were fixed in 4% formaldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 2 h at 4°C. The samples were rinsed with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3), dehydrated in a graded methanol series to 95% at -20°C, slowly embedded in Lowicryl k4M resin, and UV polymerized for 2 days. Ultrathin sections (90 nm) were obtained and transferred to nickel grids (300 mesh).

The ultrathin sections were hydrated in 0.1 M phosphate buffered saline with ASW (PBS/ASW) for 10 min, and nonspecific sites were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS/ASW containing 50 mM ammonium chloride for 10 min. The samples were incubated overnight in a humid chamber with anti-iNOS polyclonal (Sigma) diluted in PBS/ASW at 4°C. After washing with PBS/ASW, the sections were incubated with secondary goat anti-rabbit 10 nm gold-conjugated IgM antibody (Sigma) for 3 h, washed in PBS/ASW containing 1% BSA for 10 min, and finally washed with distilled water for 10 min. The sections were stained with 2% uranyl acetate for 20 min. For the controls, the incubation with the primary antibody was omitted.

6. Assay for NO_2^- / NO_3^-

For NO_2^-/NO_3^- analysis, the hemolymph was collected by puncture from the coelomic cavity of three naïve animals, as explained above, and mixed with an equal volume of MAC. Next, the mixture was centrifuged (130 X g, 4°C, 5 min). The resulting

pellet containing the hemocytes was re-suspended in PBS/ASW, and the number of hemocytes was adjusted to 10^6 cells/mL. In order to determine the effect of LPS (055:B5 from *Escherichia coli*) on the NOS activity of hemocytes, each 300 μ L sample of hemocyte suspension in PBS/ASW was incubated with 50 μ g of LPS up to 360 min, or incubated with 10, 50 or 100 μ g of LPS for 1 h. At the end of the incubation period, the samples were immediately frozen and stored at -20°C . Prior to analysis, the stored samples were subjected to ultrasonication (20 kHz, 50 W, 2x 15 s). The resulting homogenates were centrifuged (1,300 X G, 4°C , 10 min) and the supernatant was used. The amount of protein from the supernatants was quantified by the Bradford method [17], and the $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ratio was determined using a Nitric Oxide Assay Kit (No. 482702, Calbiochem) as described by Lee et al. [18]. The assay kit is based on a modified Griess method that quantifies the combined levels of nitrite and nitrate, which is taken as an indicator for NOS activity according to Leone et al. [19]. According to the manufacturer's protocol, nitrate in the samples was enzymatically reduced to nitrite, followed by degradation of excess β -NADPH and addition of the Griess reagents. The optical density was measured using a spectrophotometer at 540 nm wavelength. The levels of nitrite were measured in samples of 60 μ L each and normalized to the quantity of tissue protein, according to Bradford [17].

7. Viability test

A hemolymph aliquot was collected and the incubations with PBS/ASW or LPS were performed as described for $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ assay in different periods of time and/or different concentrations of LPS. After this, the cell viability was evaluated with trypan blue exclusion assay as described by Ford and Haskin [20].

8. *Western blotting*

8.1 Protein determination assay

Hemocytes (3×10^6) were obtained and kept in a glass tube containing a small volume of PBS/ASW (1 mL) or 100 μ g LPS from *E. coli* in order to stimulate iNOS, for 1 hour. Next, the proteins were extracted using the lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, pH 7.6) under ultrasonic waves for 1 hour. The total protein obtained was precipitated with 10% trichloroacetic acid and then dissolved in Laemmli buffer (1970) [21]. The protein concentration was determined according to the Bradford method (1976) [17] using bovine serum albumin as standard.

8.2 SDS-PAGE and immunoblotting

50 μ g of protein from each sample was used for 5% SDS-PAGE. The proteins separated were transferred to a PVDF membrane using BIO-RAD transfer (100V/40 min). Non-specific sites were blocked by incubation of membranes with the blocking reagent Block Ace (AbD Serotec, Oxford, U.K.). The monoclonal anti-mouse iNOS primary antibody used was diluted to 1:4,000. The secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse igG (1:10,000). The iNOS was detected using the chemiluminescence ECL system (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) and the film Kodak T-MAT G/RA film (Manaus, AM, Brazil). The molecular weight was determined by using prestained molecular weight standards from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, U.S.A.).

9. *“In vivo” assay and evaluation of cell migration during inflammatory-like reaction*

A solution containing 20 μ L of *E. coli* (10^7 bacteria suspended in 0.1 mL PBS/ASW) was injected into the ascidian tunic [22,23]. Five days later, the *S. plicata*

specimens were isolated, and 2-5 cm fragments of the injected tunic region were fixed as described previously and observed by light microscopy. Specimens of *S. plicata* injected with 20 μ L of PBS/ASW were used as controls. To confirm the tissue reaction, the migration of hemocytes to the tunic tissue was evaluated. The quantification was performed through the analysis of 3 specimens injected with *E. coli*, and 3 specimens injected with PBS/ASW were used as controls. Five randomly selected microscope fields (400 X magnification) were counted, and the number of hemocytes that migrated under this stimulus was evaluated. The presence of iNOS and NFkB in hemocytes that migrated to this tissue was analyzed by immunohistochemistry according to the procedures described above. Hemocytes which were not stimulated with *E. coli* were also observed (control) in order to confirm that NFkB is only expressed in the nucleus after a stimulus is given.

10. Statistical analysis

Statistical evaluations were based on analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's test using the program Statistica 6.0 from Statsoft, Inc. (Tulsa, OK, U.S.A.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

1. Morphology of hemocytes

Using TEM, we were able to distinguish five types of cells in the hemolymph of *S. plicata*: granulocytes, lymphocyte-like cells, hemoblasts, morula cells, and pigment cells. Granulocytes were the most frequent cell type (Fig. 1A). These cells had a diameter from 4.2 to 5.2 μ m, a frequently eccentric nucleus that was small compared to the entire cytoplasm volume, and cytoplasm containing numerous round granules (from 0.26 to 0.51

µm) with different electron densities. Some of these granules had an internal regular electron-dense structure similar to the crystalloids found in vertebrate basophils and mast cells.

A cell type that resembles the lymphocyte-like cells described by Sawada et al. [24] and Radford et al. [7] in ascidians was also observed in *S. plicata*. The presence of lymphocyte-like cells in invertebrates may be doubtful; however, many researchers have described cells in the hemolymph of ascidians that are morphologically similar to vertebrate lymphocytes [25-27]. These cells in *S. plicata* did not show a nucleolus in our observed sections, as described by Wright [28]. The cells measured from 3.1 to 4.8 µm in diameter; contained small vesicles resembling rough endoplasmic reticulum, sometimes continuous with the nuclear envelope; and mitochondria profiles (Fig. 1B).

Hemoblasts were approximately 6.1 µm in diameter, and did not appear very frequently. Their most prominent feature was the presence of a nucleolus, and the cytoplasm was homogeneously grainy, with few, if any, membranous organelles (Fig. 1C).

We also observed a cell type with a diameter ranging from 8.8 to 16.1 µm and with many small vesicles or small vesicles and medium vacuoles, the morula cell (Fig. 1D). The vacuoles were almost completely filled with a non-homogeneous compact electron-dense material, shown in detail in Figure 1E. Inside the vacuole, a fibrillar material could also be observed (Fig. 1E).

The last cell type observed, the pigment cells, were roundish or elliptical, with diameters ranging from 5.10 to 13.10 µm. Their typical appearance was caused by a number of globules, with diameters from 0.40 to 5.35 µm, partially or completely filled with materials of variable electron densities (Fig. 1F). When observed at a higher magnification, this material showed parallel electron-dense lines together with electron-

dense bodies (Fig. 1G). The cytoplasm of pigment cells also contained many differently shaped and sized vesicles.

2. Hemocytes which express NOS

Since NO plays an important role in mediating many aspects of inflammatory responses and is an effector molecule of cellular injury, we carried out a cytochemical reaction for NOS with NADPh-diaphorase, to investigate which cells expressed NOS after LPS stimulation. We used 100 The results for stimulated and non-stimulated cells were similar. Figs. 2A and B illustrate data obtained from non-stimulated cells. Compared to the control (Fig. 2B), with no NADPh, we observed two cell types that reacted more than the others: the morula cells and the lymphocyte-like cells. The lymphocyte-like cells reacted most (Fig. 2A). Immunoelectronmicroscopy with an antibody against iNOS confirmed this result, as shown in Figs. 2C and D, at two different magnifications.

3. Since hemocytes produce NO, do hemocytes that migrate to the pharynx also have this response?

The pharynx is the first organ to contact foreign particles, substances, or organisms in ascidians; therefore we wanted to test if circulating pharynx hemocytes also expressed NOS. Figure 3 shows that hemocytes express NOS in the pharynx. In addition to some hemocytes, both the endothelium of the vessels and the pharyngeal epithelium express iNOS, as observed in Figure 3A. Figure 3 B shows the iNOS immunolabeling at a higher magnification, evidencing the labeled hemocytes and the endothelium. Figure 3 C shows the negative control of the reaction. The NADPh-diaphorase histochemistry also

demonstrated the presence of NOS in this organ (Fig. 3D). Figure 3E is the negative control of the reaction.

4. Do hemocytes produce NO after being stimulated, as macrophages do?

The viability assay showed that in PBS/ASW (control) the percentage of cells that remain alive is higher than 95%. When LPS is added to the vials containing hemocytes and PBS/ASW, after 120 min incubation, the viability decreases from 95% to 91%. After 240 min this percentage decreases to 81%, and after 360 min, to 76%.

The $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ - generating activity in the homogenates of hemocytes ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ are, together with OONO^- , the stable products of NO formed by the reaction which converts L-arginine into L-citrulline), was evaluated using a technique based on the Griess method [21], which indirectly measures NOS activity. After stimuli with 10 - 100 μg LPS, no statistically significant differences were observed (Fig. 4A). The nitrite assay performed *in vitro* showed that when the time varied, there was no difference in nitrite production, with the exception of the last period of time considered (360 min – $21.417\% \pm 1.157$, $p < 0.05$ - Fig. 4B).

5. LPS in vitro assay did not show any increase of NO production; does an in vivo assay show a different response?

When *E. coli* was injected into the tunic, many hemocytes (a mean of 68.5 cells/microscope field) migrated to this organ, almost twice as many cells as were present in the tunic (a mean of 36.4 cells/microscope field) when only PBS/ASW was injected. Figure 5A shows hemocytes that migrated to the tunic after the injection of *E. coli*. They

are much more abundant than those shown in Figure 5B, when only PBS/ASW was injected.

Regarding the expression of iNOS, we observed that although there were substantially more hemocytes in the tunic vessels after the *E. coli* injection (Fig. 5C), the labeling intensity was similar to the hemocytes in the ascidian tunic that was injected only with PBS/ASW (Fig. 5D). Western blotting with monoclonal anti-mouse iNOS of non-stimulated hemocytes and of hemocytes incubated with LPS for 1 h showed a similar band pattern (Fig. 6).

6. Since NOS expression may be regulated by the transcription factor NFκB, what is its location in the hemocytes of the S. plicata tunic after stimulation with E. coli?

To test whether NOS expression followed the NFκB signaling pathway, which is known to regulate the expression of iNOS in at least one other invertebrate, *Limulus polyphemus* [29], we performed the immunohistochemistry for this transcription factor. Figure 7A shows the positive labeling of the hemocytes that migrated to the tunic after stimulation with *E. coli*. Figure 7B shows the nuclei of all cells in the tunic evidenced by DAPI staining. Comparing Figure 7A and B to Fig. 7C (merged from Figs. 7A and 7B), we observed that NFκB was expressed in both the cytoplasm and the nucleus of most hemocytes, confirming that NFκB was activated in these hemocytes after *E. coli* stimulus. In D we see the merge of the sections shown in the inserts, which represent the negative control of the reaction. This experiment was confirmed by a test using hemolymph that was removed from naïve animals (Fig. 8). The results showed that few cells were labeled in the

cytoplasm, and none was labeled in the nucleus. Therefore, no cell expresses nuclear NFkB, unless it is stimulated.

Discussion

In this study, new data concerning the morphology of hemocytes using conventional transmission electron microscopy were revealed. According to our observations, five types of circulating hemocytes could be distinguished: granulocytes, lymphocyte-like cells, hemoblasts, morula cells, and pigment cells (Table 1). Differently from our results, Radford et al. [7] described eight individual hemocyte types in the ascidian *S. plicata*. Their analysis was based on bright-field microscopy and cell sorting performed on immunofluorescently stained cells. In another study on the ascidian *Styela clava*, Sawada et al. [24], using light microscopy and TEM, described four types of hemocytes. We note therefore, that the classification of hemocytes in Stolidobranchia is a controversial issue. Nevertheless in this study we do not intend to suggest a new classification of *Styela* hemocytes. Instead, we want to contribute to a better understanding of hemocyte morphology, in order to characterize the functional roles of the various cell lines observed in the hemolymph.

Granulocytes received this name because of their morphological similarities to granulocytes found in ascidians of the family Botryllidae, especially *Botryllus primigenus* [6]. Granulocytes of *S. plicata* showed morphology and granular molecular contents [8] comparable to some vertebrate basophils, as in tadpoles of *Rana esculenta* [30]. Interestingly, the granules observed in *S. plicata* have ultrastructural features similar to those of higher vertebrates, such as reptiles and mammals, and since heparin and histamine

co-localize in their granules, the granulocyte could be an ancient precursor of basophils [8,31-33].

Hemoblasts have typical features of undifferentiated cells, such as a prominent nucleolus, a high nucleus/cytoplasm ratio, and few organelles. They are believed to differentiate into other cells, such as those of hematogenic nodules, germinal components, smooth muscle, and connective tissue [34-37].

Another cell type observed by TEM was the pigment cell, which has also been described in other ascidians [6,7]. The parallel electron-dense lines seen within cytoplasmic globules suggest autophagy for membrane recycling or storage of metabolic waste products [40].

Lymphocyte-like cells, which are only described for Styelidae [39], are associated with the destruction of cells within allografts, as reported by Raftos and Hutchinson [40] and Peddie et al. [27]. Interestingly, however, these cells labeled most intensely for the antibody against iNOS, suggesting that they may also mediate an innate response through NO. In Figure 5D, for example, the most intensely labeled hemocyte was the lymphocyte-like cell with a roundish profile, and another hemocyte with a similar appearance, that seems to migrate through vessels to the tunic matrix. In this environment, it acquired a somewhat spread morphology, suggesting a possible activated state.

NO is a gas produced by the oxidation of L-arginine to citrulline, mediated by the enzyme nitric oxide synthase [41]. It is known that in mammals NO is related to multiple functions, such as intra- and intercellular signaling, memory, neurotransmission, vasodilation, and defense [42,43]. In marine invertebrates, NO is also related to diverse functions, including defense [12,44-47]. Because the quantity of lymphocyte-like cells significantly increased during induced immune responses, and because these cells are

involved in innate cytotoxic reactions in *S. plicata* [40,48], we performed an immunoelectronmicroscopy using the antibody against iNOS. Since the reaction was positive in lymphocyte-like cells, we here demonstrated for the first time that *Styela* lymphocyte-like cells reacted with the antibody against iNOS, indicating that NO may be a functional product of these cells.

The morula cells contain vacuoles with electron-dense material and clusters of particles or filaments. Similar cells were considered as either cytotoxic cells [49] or cells related to the allorejection reaction between colonies [50,51], being capable of activating the phenoloxidase system [52]. Differently from Styelidae, in Botryllidae no lymphocyte-like cell has been described so far; however, NO was produced by morula cells after a stimulus with cytokines. In addition, our results showed NOS labeling in morula cells, although not as intense as observed for lymphocyte-like cells. Our experiments designed to induce an immune response with LPS did not show any significant increase of NO production, in contrast to the results obtained by Cima et al. [12] with heterologous serum in *Botryllus schlosseri*. Thus, we cannot exclude the possibility that morula cells may be related to the induction of lymphocyte-like cells to produce NO in *S. plicata*.

Nevertheless, the failure of LPS injection to affect NO production, in contrast to mammalian macrophages [53], may be explained by the possibility that LPS is not the best stimulus for increasing NO levels, as it is for the mussel *Mytilus galloprovincialis* [54,55]. In fact, we plan other approaches to assess whether other mechanisms can better activate NO production, or if other stimuli are required for increasing NO production. We cannot rule out the possibility that in *S. plicata*, as in *C. intestinalis*, only one NOS gene is being expressed [15]. Since in *S. plicata* there was no increase in NO generation, this could indicate that active NOS is in the constitutive isoform. Alternatively, the NO levels of the

controls may be similar to those stimulated by LPS, because the ascidians were collected from a eutrophic region of Guanabara Bay in Rio de Janeiro, and therefore, they could be naturally stimulated by *E. coli*.

NO can modulate the release of various inflammatory mediators from a wide range of cells participating in inflammatory responses. For example, it can modulate blood flow, adhesion of leukocytes to the vascular endothelium, and the activity of numerous enzymes [56]. Although no increase in the NO level was detected after injection of *E. coli* in the ascidian *S. plicata*, we observed that many cells migrated to the tunic, starting an inflammatory-like reaction. It was observed that the cells that migrated to the tunic produced NO. This gas may have had the role of attracting more cells, which in their turn may have released more inflammatory mediators in the microenvironment.

However, since no increase in the NO level was detected after injection of *E. coli* in the ascidian *S. plicata*, we inquired whether another mechanism is triggered after the LPS stimulus. In mammals, NF κ B activation is involved in many pathways related to innate immunity, such as inflammation, cell migration, and repair. On the other hand, in an invertebrate considered a “living fossil”, the horseshoe crab *Limulus polyphemus*, NF κ B is involved with pathogen recognition, bactericidal activity, and possibly iNOS signaling [29]. Interestingly, our results suggested an activation of NF κ B, since its presence was demonstrated in the nuclei of the hemocytes. NF κ B activation is possibly triggering a signal responsible for the migration of hemocytes. However, we cannot state that NF κ B stimulates iNOS production, since our results did not show any significant increase of NO stimulated by LPS.

In conclusion, the results obtained by TEM will contribute to the classification of ascidian hemocytes, since their detailed structure could be observed. Additionally, the experimental approach used here suggests new routes to explore the immune functions performed by ascidians.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CAPES, FAPERJ, FUJB, and SR2/UFRJ.

M.S.G.P. and S.A. are research fellows of CNPq. We are grateful to Jorge Luís da Silva for technical support, and to the Hertha Meyer Cell Ultrastructure Laboratory, UFRJ, for the electron microscopy facilities. We are also indebted to the Laboratory of Bacteria Molecular Biology, UFRJ for supplying the *E. coli*.

References

- [1] Cooper EL, Parrinelo N. Immunodefense in tunicates: cells and molecules. In: Sawada H, Yokosawa H, Lambert CC, editors. The biology of ascidians, Springer, Tokyo, 2001. p. 383-91.
- [2] Pawelek JM, Lerner AB. 5,6-Dihydroxyindol is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature* 1978; 276: 627-8.
- [3] Pawelek JM, Korner AM. The biosynthesis of a mammalian melanin. *Am Sci* 1982; 70: 136-45.
- [4] Söderhäll K, Smith VJ. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. In: Gupta AP. editor. Humoral and cellular immunity in arthropods. John Wiley and Sons, New York. 1986a. p. 251-85.
- [5] Yeh F-C, Wu S-H, Lai C-Y, Lee C-Y. Demonstration of nitric oxide synthase activity in crustacean hemocytes and anti-microbial activity of hemocyte-derived nitric oxide. *Comp Biochem Physiol B* 2006; 144: 11-7.
- [6] Hirose E, Shirae M, Saito Y. Ultrastructures and classification of circulating hemocytes in 9 botryllid ascidians (Chordata: Ascidiacea). *Zool Sci* 2003; 20: 647-56.
- [7] Radford JL, Hutchinson AE, Burandt M, Raftos DA. A hemocyte classification scheme for the tunicate *Styela plicata*. *Acta Zool* 1998; 79: 343-50.
- [8] De Barros MC, Andrade LR, Allodi S, Viskov PA, Mourier PA, Cavalcante CM et al. The hemolymph of the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and an unique sulfated galactoglucan in the plasma. *J Biol Chem* 2007; 282(3): 1615-26.

- [9] Cavalcante MC, Allodi S, Valente AP, Straus AH, Takahashi HK, Mourão PA, Pavão MS. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. An ancient role in defense? *J Biol Chem* 2000; 275: 36189-96.
- [10] Cavalcante MC, de Andrade LR, Du Bocage Santos-Pinto C, Straus AH, Takahashi HK, Allodi S, Pavão MS. Colocalization of heparin and histamine in the intracellular granules of test cells from the invertebrate *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *J Struct Biol* 2002; 137: 313-21.
- [11] Cima F, Ballarin L, Gasparini F, Burighel P. External amebocytes guard the pharynx entry in a tunicate (Ascidiacea). *Dev Comp Immunol* 2005; 30: 463-72.
- [12] Cima F, Sabbadin A, Ballarin L. Cellular aspects of allorecognition in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 881-9.
- [13] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593–615.
- [14] Ghosh DK, Salerno JC. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci* 2003; 8: d193–d209.
- [15] Comes S, Locascio A, Silvestre F, d'Ischia M, Russo GL, Tosti E, Branno M, Palumbo A. Regulatory roles of nitric oxide during larval developmental and metamorphosis in *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* 2007; 306: 772-84.
- [16] Smith VJ, Peddie CM. Cell cooperation during host defense in the solitary tunicate *Ciona intestinalis* (L). *Biol Bull* 1992; 138: 379-88.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

- [18] Lee CY, Zou HS, Yau SM, Ju YR, Liau CS. Nitric oxide synthase activity and immunoreactivity in the Crayfish, *Procambarus clarkii*. Neuroreport 2000b; 11: 1273-76.
- [19] Leone AM, Rhodes P, Furst V, Moncada S. Techniques for the measurement of nitric oxide in Signal Transduction Protocols. In: Kendall DA, Hill SJ. editors. Signal Transduction Protocols Humana Press, Totowa, New Jersey 1995. p. 285-99.
- [20] Ford S E, Haskin HH. Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*, Comp Biochem Physiol 1988; 90A: 183-87.
- [21] U K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970; 227: 680-5.
- [22] De Leo G, Parrinello N, Parrinello D, Cassara G, Russo D, Di Bella MA. Encapsulation response of *Ciona intestinalis* (Ascidiacea) to intratunical erythrocyte injection. J Invert Pathol 1997; 69: 14-23.
- [23] Di Bella MA, De Leo G. Hemocyte migration during inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata, Ascidiacea). J Inv Pathol 2000; 76: 105-11.
- [24] Sawada T, Zhang J, Cooper EL. Classification and characterization of hemocytes in *Styela clava*. Biol Bull 1993; 184: 87-96.
- [25] Fuke M T. Studies on the coelomic cells of some Japanese ascidians. The Bull Mar Biol Stant Asam, Tohoku University 1979; 16: 142-59.
- [26] De Leo G. Ascidian hemocytes and their involvement in defence reactions. Boll Zool 1992; 59: 195-213.
- [27] Peddie MC, Riches AC, Smith VJ. Proliferation of undifferentiated blood cells from the solitary ascidian, *Ciona intestinalis in vitro*. Dev Comp Immunol 1995; 19: 377-87.

- [28] Wright RK. Urochordates. In: Ratcliffe NA, Rowley AF. editors. Invertebrate blood cells. Academic Press, London, 1981 p. 565-626.
- [29] Wang XW, Tan NS, Ho B, Ding JL, Evidence for the ancient origin of the NF- κ B/I κ B cascade: Its archaic role in pathogen infection and immunity. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 4204-9.
- [30] Frank G. Granulopoiesis in tadpole of *Rana esculenta*. Ultrastructural observations on the morphology and development of heterophil and basophil granules. J Anat 1989; 163: 107-16.
- [31] Winqvist G. The ultrastructure of the granules of the basophil granulocyte. Z Zellforsch Mikrosk Anat 1960; 52: 475-81.
- [32] Taylor KW, Kaplan HM, Hirano T. Electron microscope study of turtle blood cells. Cytologia 1963; 28: 248-56.
- [33] Wetzel BK, Horn RG, Spicer SS. Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil, and basophil granulocytes in rabbits. Lab Invest 1967; 16: 349-82.
- [34] Freeman G. The role of blood cells in the process of asexual reproduction in the tunicate *Perophora viridis*. J Exp Zool 1964; 156: 157-83.
- [35] Mukai H, Watanabe H. Studies on the formation of germ cells in a compound ascidian *Botryllus primigenus*. Oka J Morph 1976; 148: 337-62.
- [36] Ermak TH. The renewing cell populations of ascidians. Am Zool 1982; 22: 795-805.
- [37] Cloney RA. Origin and differentiation of the inner follicular cells during oogenesis in *Molgula pacifica* (Urochordata), an ascidian without test cells. Acta Zool 1995; 76: 89-104.

- [38] Burighel P, Cloney RA. Urochordata: Ascidiacea. In: Harrison FW, Rupert EE. editors. Microscopy anatomy of invertebrates. Wiley-Liss, New York, 1997. p. 221-347.
- [39] Parrinelo N, Cammarata M, Vazzana M, Arizza V, Vizzini A, Cooper EL. Immunological activity of ascidian hemocytes. In: Sawada H, Yokosawa H, Lambert CC, editors. The biology of ascidians. Springer Verlag, Tokyo, 2001. p. 395-400.
- [40] Raftos DA, Hutchinson A. Cytotoxicity reactions in the solitary tunicate *Styela plicata*. Devel Comp Imm 1995; 19(6): 463-71.
- [41] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86: 9030-33.
- [42] Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature 1988; 336: 385-8.
- [43] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142.
- [44] Stefano GB, Ottaviani E. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. Brain Res 2002; 924: 82-9.
- [45] Tafalla C, Gomez-Leon J, Novoa B, Figueras A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. Dev Comp Immunol 2003; 27: 197-205.
- [46] Fiori G, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M, Palumbo A. Dopamine in ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. Biochem J 2004; 378: 785-91.

- [47] Palumbo A. Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective. *Comp Biochem Physiol A* 2005; 42: 241-8.
- [48] Raftos DA, Tait NN, Briscoe DA. Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol* 1987; 11: 713-25.
- [49] Ballarin L, Cima F, Sabbadin A. Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* 1998; 22: 479-92.
- [50] Hirose E, Salito Y, Watanabe H. Subcuticular rejection: an advanced mode of the allogenic rejection in the compound ascidians *Botrylloides simodensis* and *B. fuscus*. *Biol Bull* 1997; 192: 53-61.
- [51] Shirae M, Ballarin L, Frizzo A, Saito Y, Hirose E. Involvement of quinines and phenoloxidase in the allorejection reaction in a colonial ascidian, *Botrylloides simodensis*: Histochemical and immunohistochemical study. *Mar Biol* 2002; 141: 659-65.
- [52] Cammarata M, Arizza V, Parrinello N, Candore G, Caruso C. Phenoloxidase-dependent cytotoxic mechanism in ascidian (*Styela plicata*) hemocytes active against erythrocytes and K562 tumor cells. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 302-7.
- [53] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
- [54] Novas A, Cao A, Barcia R, Ramos-Martinez JI. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *IJBCB* 2004; 36: 390-94.
- [55] Arumugam M, Romestand B, Torreilles J, Roch P. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol.* 2000; 79: 513-9.

[56] Wallace J L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 5-9.

Legends to the figures

Figure 1 – **Ultrastructure of hemocytes.** (A) Granulocyte displaying an eccentric nucleus and many granules in the cytoplasm, with different electron densities (arrows). Note that in some granules (short arrow within the insert) internal electron-dense crystalloids are observed. (B) Lymphocyte-like cells showing small vesicles and mitochondria profiles (arrows). (C) Hemoblast with a prominent nucleolus (**Nu**). (D) Morula cell with small vesicles (**v**) and medium-sized vacuoles, which are almost completely filled with a non-homogeneous compact electron-dense material. (E) Higher magnification of the electron-dense material and fibrils observed inside the vacuoles of a morula cell (arrow). (F) Pigment cell with many globules of different sizes and with varying electron densities. (G) A higher magnification of a globule reveals parallel electron-dense lines together with electron-dense bodies. Scale bars, (A) 0.6 μm , Insert 0.85 μm , (B) 0.62 μm , (C) 0.87 μm , (D) 1.4 μm , (E) 0.14 μm , (F) 1.43 μm , (G) 0.014 μm .

Figure 2 – **Hemocytes of *Styela plicata* express NOS.** (A) NADPh-diaphorase histochemistry of hemocytes. Notice two strongly labeled cells (arrows) among other stained cells. (B) Negative control of the reaction. (C, D) Immunoelectronmicroscopy with an antibody which revealed iNOS (arrows) in the cytoplasm of a lymphocyte-like cell at two different magnifications. (N) nucleus. Scale bar, (A) 4 μm , (B) 10 μm , (C) 0.17 μm , (D) 0.2 μm .

Figure 3 – Hemocytes expressing NOS in the pharynx of *Styela plicata*. (A)

Immunohistochemistry using a primary antibody against iNOS. The long arrow indicates the pharynx epithelium, and the short arrow, the vessel endothelium. **(B)** iNOS immunolabeling at a higher magnification, showing the labeled hemocytes (arrowhead) and the endothelium. **(C)** Negative control of the reaction. **(D)** NADPh-diaphorase histochemistry showing NOS in this organ. **(E)** Negative control of the reaction. Scale bar, **(A)** 9.00 μm , **(B)** 25 μm , **(C)** 33 μm , **(D)** 9.00 μm , **(E)** 9.00 μm .

Figure 4 – Nitrite/nitrate-generating activity in the homogenates of hemocytes of *Styela plicata*. (A) NOS activity according to the different concentrations of LPS after 60 min.

Data are the mean \pm S.E.M. and expressed as a percentage of control enzyme activity (n = 3 for each treatment). **(B)** NOS activity after different periods of time following stimulus with 50 μg LPS.* represents significant difference from control at the level of 0.05.

Figure 5 – Hemocytes of *Styela plicata* migrate to the tunic after injection of *E. coli*. (A)

After injection of *E. coli*, many hemocytes are seen in the tunic matrix and within a vessel at the lower right. **(B)** After injection of PBS/ASW, only a few hemocytes are seen in the tunic matrix and within the vessel at the right. **(C)** iNOS immunohistochemistry showing labeled hemocytes within a vessel (arrows) after the *E. coli* injection. **(D)** iNOS immunohistochemistry showing labeled hemocytes within a vessel (arrows) after PBS/ASW injection. Insert: negative control of the reaction. T: Tunic; BV: Blood Vessel. Scale bar, **(A)** 50 μm , **(B)** 50 μm , **(C)** 20 μm , **(D)** 20 μm , Insert 95 μm .

Figure 6 – **Western blotting of iNOS.** Immunoblotting of iNOS using anti-mouse iNOS antibody. Control: non-stimulated hemocytes. LPS: hemocytes stimulated with 100 µg/mL LPS.

Figure 7 – **Expression of NFκB in hemocytes from the tunic of *Styela plicata* after stimulation with *E. coli*.** (A) Immunohistochemistry for NFκB showing labeled hemocytes in the tunic after injection of *E. coli*. (B) DAPI nuclear staining in the same section as in A. (C) Merge of A and B. Observe that NFκB is expressed both in the cytoplasm and the nucleus of most hemocytes. (D) Merge of the sections shown in the inserts, which represent the negative control of the reaction (to the left) and the DAPI staining (to the right). Scale bar, (A) 50 µm, (B) 50 µm, (C) 50 µm, (D) 50 µm, Left insert 117 µm, Right insert 117 µm.

Figure 8 – **Expression of NFκB in non-stimulation hemocytes of *Styela plicata*.** (A) Immunohistochemistry for NFκB showing some hemocytes labeled only in their cytoplasm. (B) DAPI nuclear staining in the same section as in A. (C) Merge of A and B. Observe that NFκB is expressed only in the cytoplasm of some hemocytes, and it is not activated in the nucleus. (D) Merge of sections shown in the inserts, which represent the negative control of the reaction (upper insert) and the DAPI staining (lower insert). Scale bar, (A) 50 µm, (B) 50 µm, (C) 50 µm, (D) 50 µm, Upper insert 50 µm, Lower insert 50 µm.

Figure 1

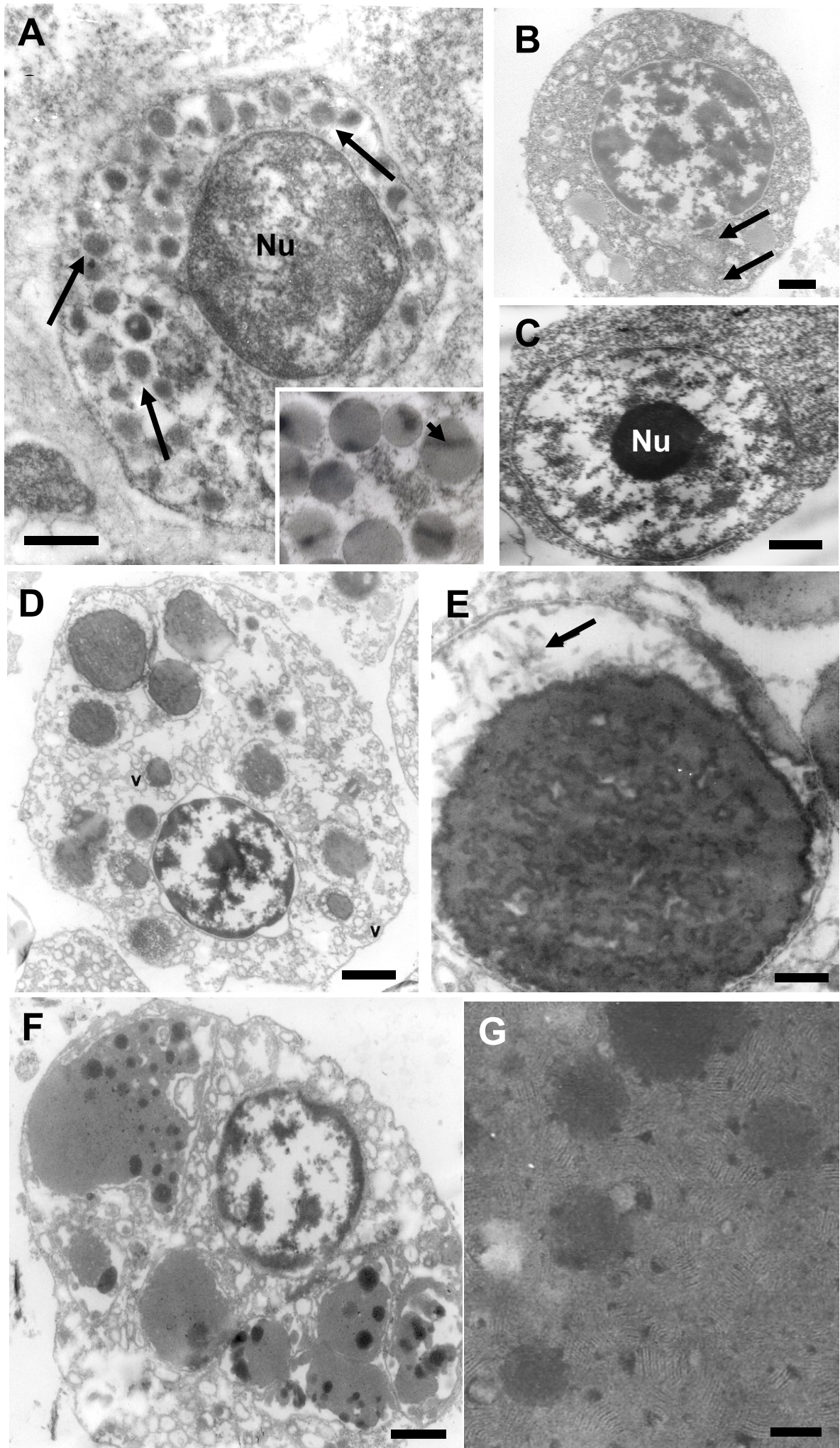


Figure 2

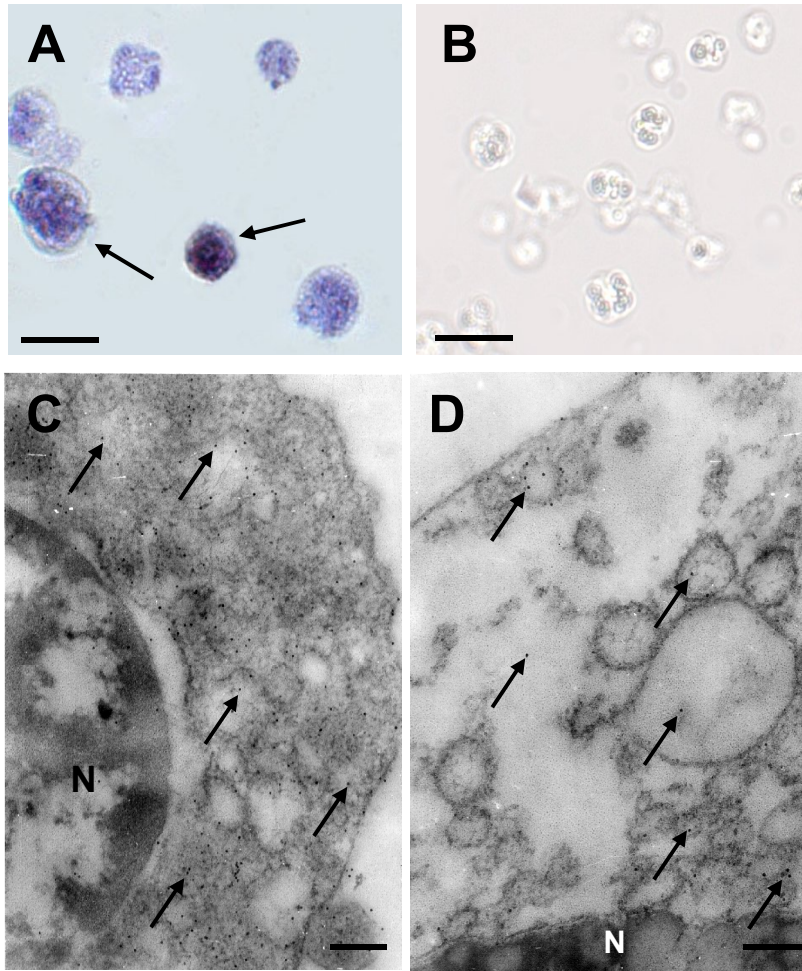


Figure 3

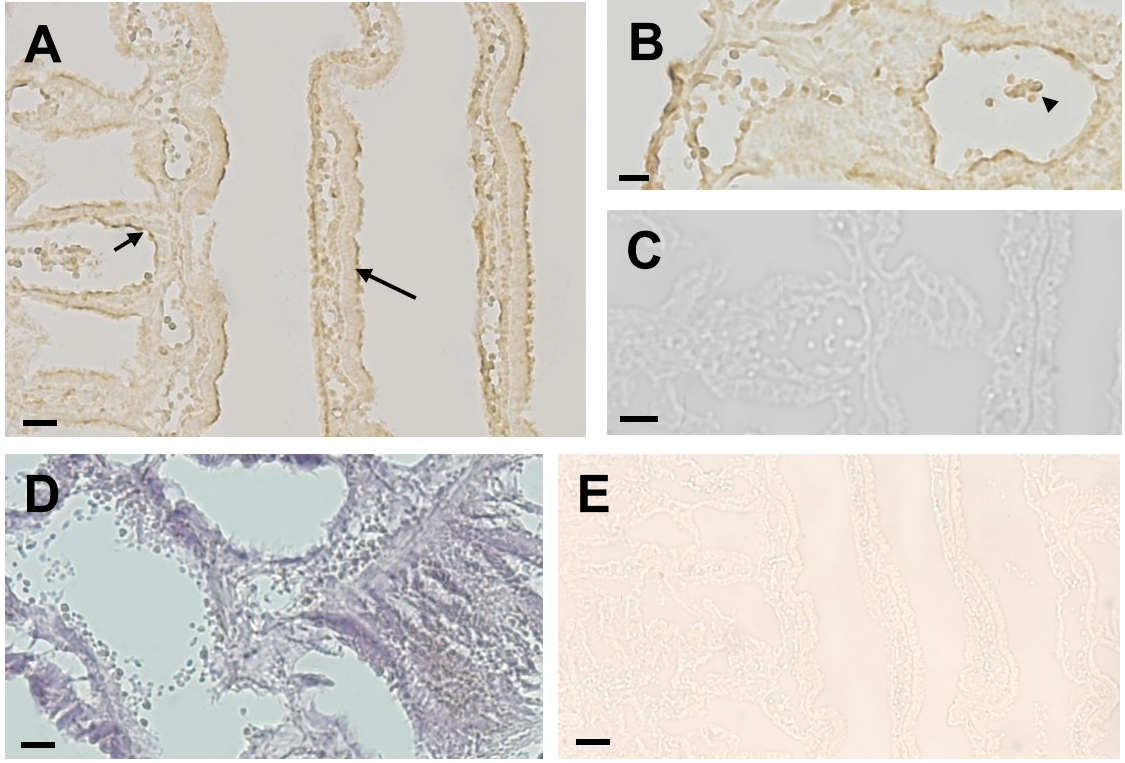
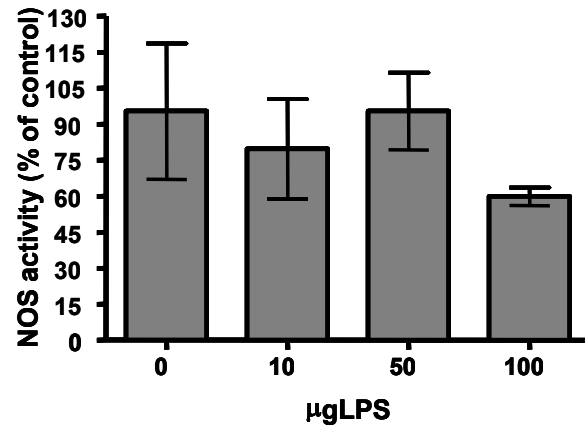


Figure 4

A



B

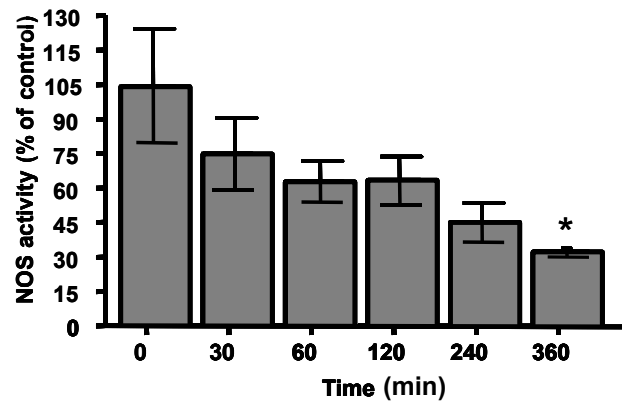


Figure 5

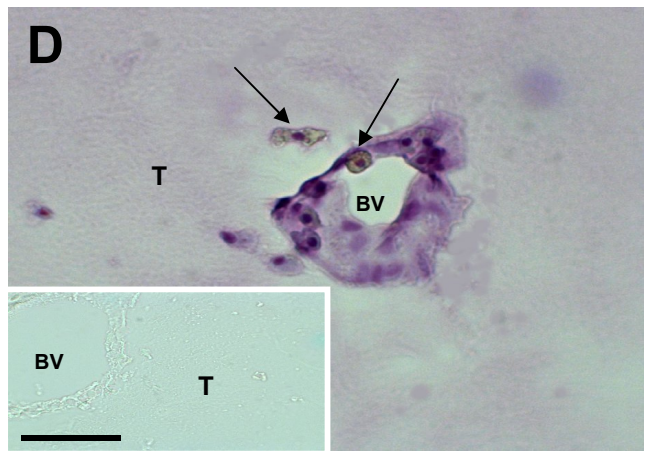
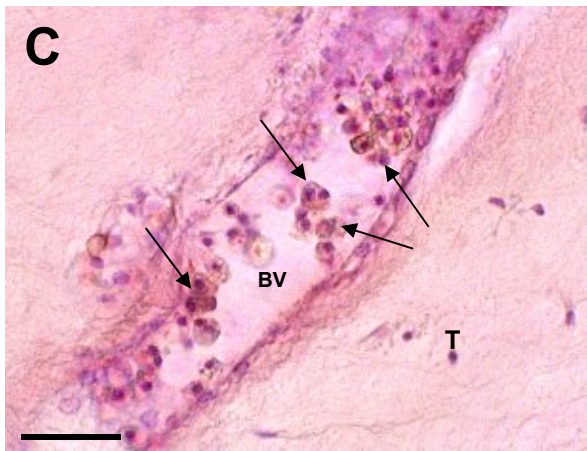
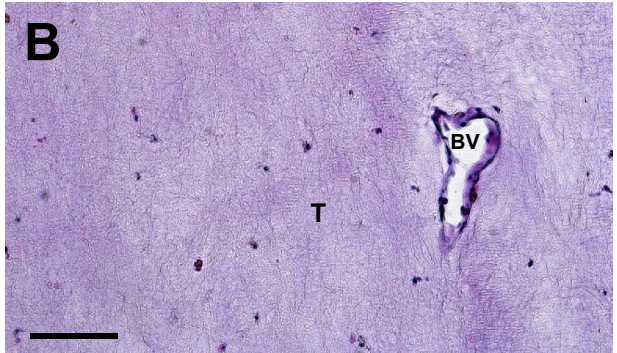
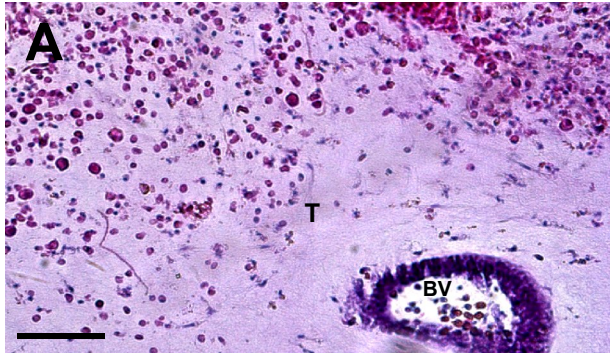


Figure 6

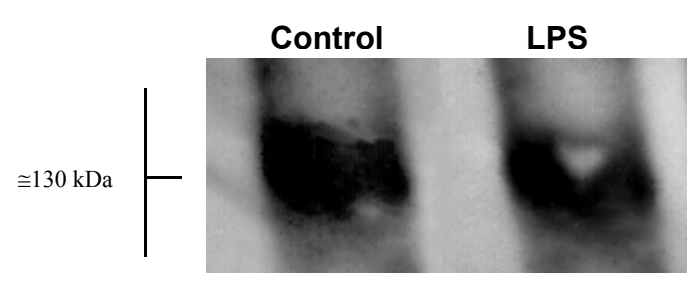


Figure 7

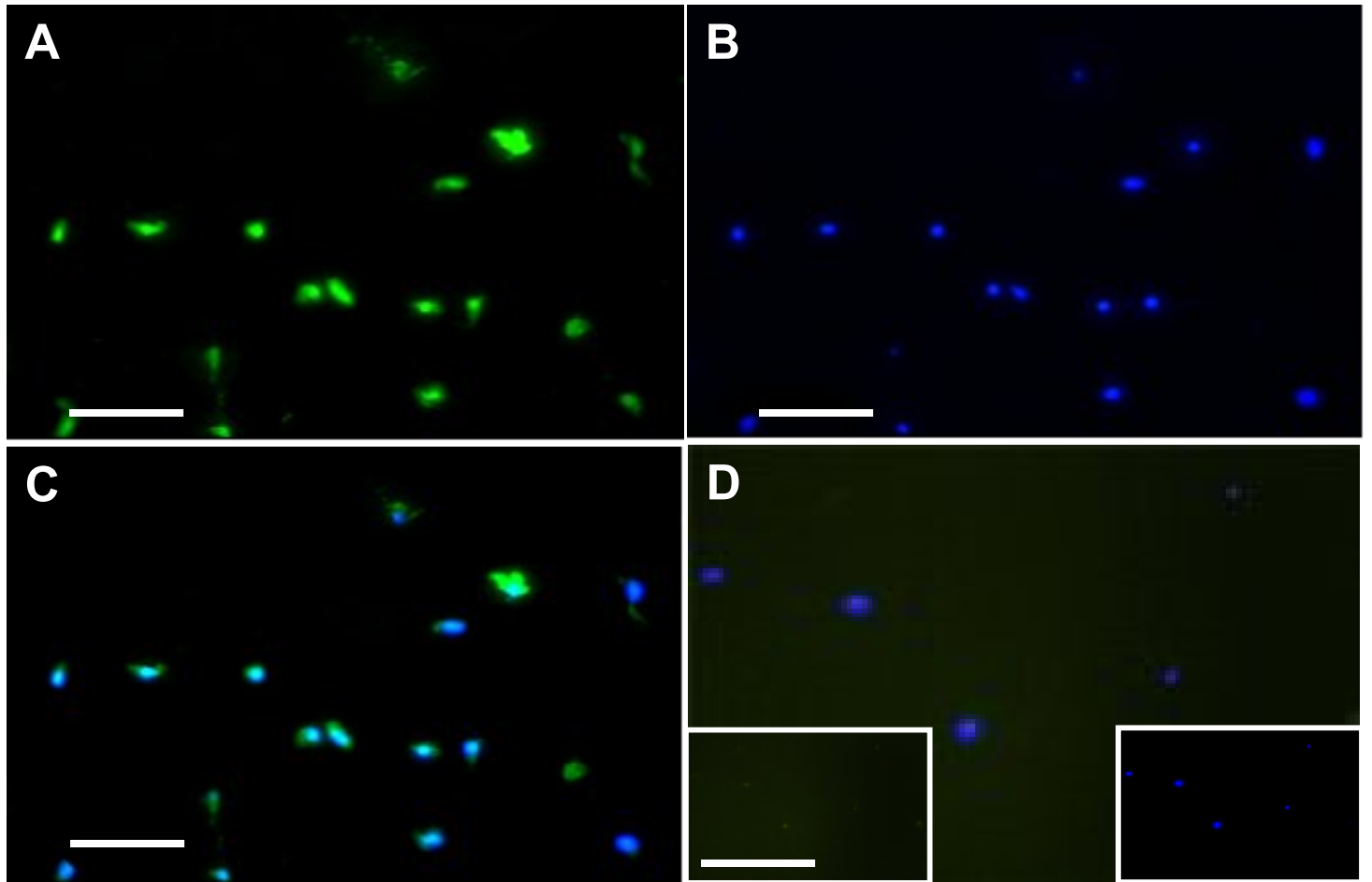


Figure 8

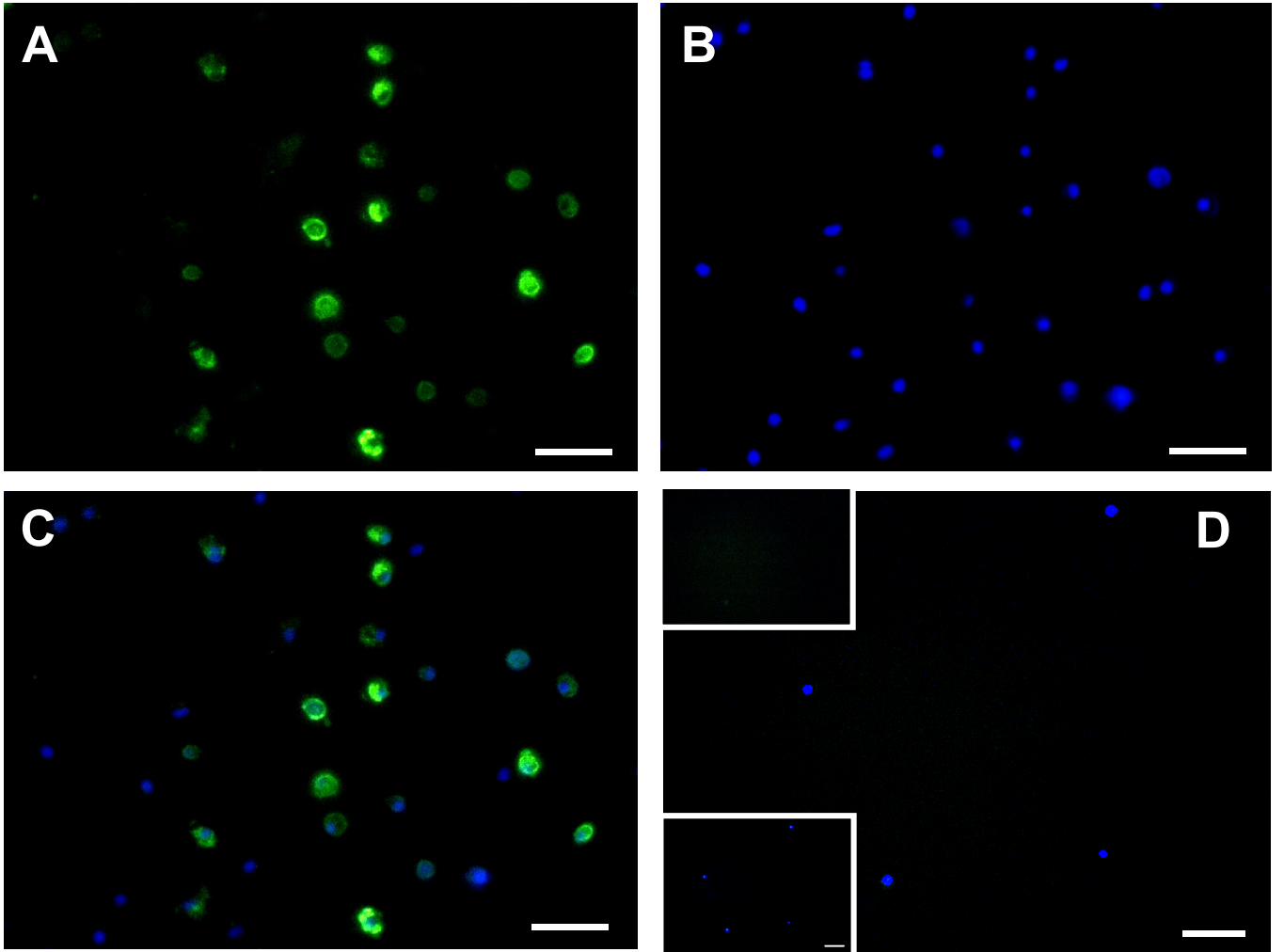


TABLE 1: Blood cell types

Cell Types	Size	Content	Possible funtion
Granulocytes	4.2 to 5.2 μm	Heparin and Histamine	Basophil-like (De Barros <i>et al.</i> 2007)
Lymphocyte-like	3.1 to 4.8 μm	Nitric Oxide	Signaling in defense mechanisms (present study)
Hemoblast	6.1 μm	—	Hemopoiesis (Wright , 1981)
Morula Cell	8.8 to 16.1 μm	Phenoloxidase	Cytotoxicity, wound repair and coagulation (Cammarata <i>et al.</i> , 1997)
Pigment Cell	5.10 to 13.10 μm	Nitrogenous compounds	Pigmentation ((Wright , 1981))

Collagen colocalizes with a protein containing a decorin-specific peptide in the tissues of the ascidian *Styela plicata*

Mario Gandra^{a,b,1}, Eliene O. Kozlowski^{a,b,1}, Leonardo R. Andrade^c, Cintia M. de Barros^{a,b,c}, Bernardo M.O. Pascarelli^c, Christina M. Takiya^c, Mauro S.G. Pavão^{a,b,c,*}

^a Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Brazil

^b Instituto de Bioquímica Médica-Programa de Glicobiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil

^c Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

Received 6 October 2005; received in revised form 17 February 2006; accepted 19 February 2006

Available online 2 March 2006

Abstract

Decorin is an extracellular matrix dermatan sulfate/chondroitin sulfate proteoglycan found in a variety of vertebrate species. In the extracellular matrix of mammals, decorin interacts with fibrillar collagen and regulates its morphology. We report here the occurrence and distribution of collagen type I and the peptide, CEASGIGPEVPDDRD, which is present in the human decorin proteoglycan, in the extracellular matrix of different tissues of the primitive invertebrate chordate *Styela plicata*. The content of collagen was estimated by hydroxyproline, and its distribution in the tissues by histochemistry. Collagen was detected biochemically in intestine, heart, pharynx and mantle, occurring in higher amounts in the heart, followed by pharynx, mantle and intestine. Histochemical analysis with Sirius red indicates that collagen is present in the extracellular matrix of intestine and pharynx. Further ultrastructural immuno-gold assays using polyclonal antibodies raised against the decorin-specific peptide CEASGIGPEVPDDRD and collagen type I showed a co-localization of these molecules. These data suggest the occurrence of a protein containing a decorin-like peptide sequence, which may be interacting with fibrillar collagen in this primitive chordate.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ascidian; Primitive chordate; Collagen; Decorin; Dermatan sulfate; Immunolocalization; Proteoglycan; Ultrastructure

1. Introduction

Decorin is a proteoglycan, member of the SLRP (Small Leucine-Rich Proteoglycans) family of proteins. The protein cores of the genetically related members of this family share similar physical and structural features such as molecular weight (35–43 kDa), 6–10 leucine-rich repeat (LRR) in a central domain, conserved Cys residues in the N- and C-terminals and substitution with keratan sulfate/dermatan sulfate/chondroitin sulfate chain(s). Decorin, which has a single dermatan sulfate/chondroitin sulfate chain in the N-terminal

domain, together with biglycan and asporin, form Class I in this family, with 10 LRR and a CX₃CXCX₆C amino terminal cysteine cluster (Iozzo, 1998; Hocking et al., 1998; Ameye and Young, 2002).

Maintenance of the extracellular matrix integrity is a well-known function of some of the SLRP members. Decorin, biglycan, fibromodulin and lumican have been reported to interact with matrix components, regulating their arrangement. Decorin binds to collagen type I and II in vivo and delay/inhibits collagen fibrillogenesis in vitro (Vogel et al., 1984; Brown and Vogel, 1989; Schonherr et al., 1995). The interaction of decorin with fibrillar collagen is mediated by the protein core and seems not to depend on the glycosaminoglycan side chain (Hedbom and Heinegard, 1993). The horseshoe shape of decorin was believed to allow the proteoglycan to “embrace” the collagen triple helix monomer (Weber et al., 1996; Keene et al., 2000; Scott, 1996). However, recent report on the crystal structure of decorin

* Corresponding author. Instituto de Bioquímica Médica-Programa de Glicobiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil. Tel.: +55 21 2562 2093; fax: +55 21 2562 2090.

E-mail address: mpavao@hucff.ufrj.br (M.S.G. Pavão).

¹ Authors contributed equally to this work.

indicates that this model has to be re-evaluated (Scott et al., 2004). Targeted disruption of the genes of several SLRP members leads to a series of phenotypic changes in extracellular matrix components. Decorin deficient mice for example show fragile tensile strength and abnormal collagen fibril diameter and shape (Danielson et al., 1997).

The biological importance of decorin is not restricted to the matrix. It is also a key molecule in several cellular events. Binding of decorin to TGF- β has been shown to happen, even when the proteoglycan is bound to collagen, regulating cell growth control in both normal and pathological conditions. (Markmann et al., 2000 and see Kresse and Schonherr, 2001 for a review). In fact, several reports showed that the complex decorin/TGF- β is more efficient than the cytokine alone in signaling events (Takeushi et al., 1994; Riquelme et al., 2001). Moreover, it has been demonstrated that decorin binds and activates EGF¹ receptor (EGFR) triggering intracellular signaling that leads to MAP kinases activation, mobilization of intracellular calcium and up-regulation of p21, a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity (De Luca et al., 1996; Moscatello et al., 1998; Iozzo et al., 1999).

Previously we reported the presence of oversulfated dermatan sulfate polymers in the ascidians *Styela plicata* and *Ascidia nigra* (Pavão et al., 1994, 1995, 1998; Gandra et al., 2000; and see Pavão, 2002 for a review). Histochemical analysis of the tissues of *S. plicata* indicated that dermatan sulfate is restricted to the extracellular matrix of the ascidian organs and is absent in the tunic (Gandra et al., 2000). Collagen was also detected in the tissues of this ascidian, based on the content of hydroxyproline (Pavão et al., 1994). The type of collagen was not specified.

The occurrence of extracellular dermatan sulfate and collagen in the tissues of *S. plicata* raises interesting questions: is the oversulfated dermatan sulfate linked to a decorin-like core protein? Do dermatan sulfate proteoglycans and collagen co-localize in the ascidian tissues? Here we show the occurrence of a decorin-specific peptide in this ascidian, and its co-localization with collagen and dermatan sulfate.

2. Materials and methods

2.1. Hydroxyproline

The content of hydroxyproline (the hydroxylated form of the collagen-specific amino acid proline) was estimated as described previously (Stegemann and Stalder, 1967). Briefly, intestine, heart, pharynx and mantle were carefully isolated from *S. plicata* (the animals were collected at praia da Urca, Rio de Janeiro, Brazil), immersed in acetone for 8 h at 4°C and dried in an oven at 60°C. About 30 mg of the dried material was subjected to acid hydrolysis with 6 N HCl at 107°C for 18 h. The HCl was removed by evaporation and the hydrolyzed material was mixed with 200 μ L of buffer (5% citric acid, 1.2% acetic acid, 12% sodium acetate and 3.4% sodium hydroxide, pH 6.0) 1:10 diluted. The mixture was

incubated with 1 mL of chloramine-T solution for 20 min at room temperature. After that time, 1 mL of aldehyde/perchloric acid solution was added and incubated for another 15 min at 60°C. Absorbance at 570 nm was then measured within 20 min. The concentration was estimated based on a standard curve using a pure solution of hydroxyproline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3. Histochemistry

For histochemical preparations intestine and pharynx were carefully isolated from other tissues and fixed in 1% glutaraldehyde and 5% formaldehyde in cacodylate buffer, pH 7.4 for 22 h at room temperature. After fixation, the tissues were dehydrated in graded ethanol, cleared in xylol and embedded in Paraplast plus (m.p. 55.6°C, Oxford, Sherwood Medical, St. Louis, MO, USA). Four-micrometer sections from intestine and pharynx were cut longitudinally on a Leica microtome. Paraffin sections were stained with a modified Sirius red stain that has affinity to collagen fibers (Dolber and Spach, 1993). After dewaxing, sections were hydrated and treated with a 0.2% aqueous phosphomolybdic acid solution, followed by a 0.1% Sirius red F3 BA (Aldrich) in a saturated aqueous picric acid solution, pH 2.0, for 90 min and washed with 0.01 N HCl for 2 min. Sections were then rinsed in 70% ethanol, dehydrated in absolute ethanol, cleared in xylol (Dolber and Spach, 1993), mounted in Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Germany) and then observed with a Zeiss LSM 410 confocal laser scanning microscope or with an optical microscope (Axioplan, Zeiss) under a polarized light.

3.1. Immunohistochemistry

Paraffin sections from intestine and pharynx were prepared, as described in the previous paragraph, and collected onto 0.01% poly-L-lysine (Sigma) covering slides. After dewaxing, sections were hydrated and then carefully washed in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), followed by 50 mM NH₄Cl in PBS to avoid unspecific binding of free aldehydes residues. Endogenous peroxidase was blocked with a 3% H₂O₂ in methanol for 15 min and incubated with 10% bovine serum albumin (BSA) in PBS (pH 7.4) for 1 h to prevent unspecific binding of immunoglobulins. Sections were then incubated with a polyclonal antiserum derived from a rabbit immunized with the decorin-specific peptide CEASGIGPEVPDDRD (GIBCO BRL, USA, Cat. 12100-010), overnight at 4°C in a moist chamber (1:250). After washing with PBS, sections were incubated for 1 h with a horse HRP-conjugated secondary antibody from the kit Envision TM System Labelled Polymer, HRP (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Peroxidase was revealed with diaminobenzidine (DAB liquid DAB+ substrate-chromogen system K3468, Dako Corporation). Sections were then counterstained with PAS and hematoxylin, mounted in Entellan[®] and examined under an optical microscope (Axioplan, Zeiss). High-resolution images (1024 \times 1024 pixels) were obtained on a digital camera

(Zeiss) coupled to an image acquisition program (Axiovision, Zeiss). Control assays were carried out by omitting the primary antibody.

3.2. Immuno-gold

The pharynx was carefully isolated from *S. plicata* and fixed overnight in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.3) and 4% 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDCDI-Sigma) at 4°C. The samples were washed with 0.05% sodium borohydride in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) and seawater 1:1, dehydrated in a graded series of methanol until 95% and embedded in LR White acrylic resin (Ted Pella, Inc.) at -20°C. Ultrathin sections (90nm) were obtained (LKB ultramicrotome) and collected on nickel grids (300mesh), hydrated in 1% PBS for 10min, and non-specific sites were blocked with 1% BSA in 1% PBS, containing 50mM ammonium chloride for 10min. The samples were incubated overnight in a humid chamber with a rabbit anti-human decorin polyclonal antibody raised against peptide CEAS-GIGPEVPDDR (Gibco, USA) (1:200) or with a rabbit anti-human collagen type I polyclonal antibody (1:50), raised against the N-terminal (Novotec, Lyon, France), diluted in 1% PBS. After washing with 1% PBS, the sections were incubated with an anti-rabbit immunoglobulin conjugated to 10nm gold particles for 2h, washed in 1% PBS, containing 1% BSA, and finally with distilled water. The sections were stained with 1% uranyl acetate for 20min and observed in a Jeol 1200 EX electron microscope, operated at 80kV. Controls were obtained omitting the incubation with the primary antibody.

3.3. Analysis of the material extracted from the ascidian tissues with guanidine and papain

The viscera of *S. plicata* were cut in small pieces and extracted with 4M or 6M guanidine hydrochloride in 50mM sodium acetate, pH 6.0, containing 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10mM EDTA, 5mM benzamidine, 10mM 6-aminocaproic acid, for 48 h at 4°C. The mixture was then centrifuged, the supernatant dialyzed against distilled water at 4°C, lyophilized and resuspended in distilled water (1 mg/mL). The residue was washed with distilled water, immersed in acetone and kept for 24h at 4°C. The dried residue (1g) was suspended in 20mL of 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.5), containing 100mg papain, 5mM EDTA, and 5mM cysteine and incubated at 60°C during 24h. The incubation mixture was then centrifuged (5000×g for 10min at room temperature) and the polysaccharides in the supernatant, precipitated with 2vol. of 95% ethanol at 4°C for 24h. The precipitate formed was collected by centrifugation (5000×g for 10min at room temperature), dried at 60°C and suspended in distilled water (1.0mg/mL). The material obtained after extraction with guanidine or papain (~10µg) was analyzed by agarose gel electrophoresis before and after incubation with chondroitinase ABC, as previously described (Gandra et al., 2000).

4. Results

4.1. Localization of dermatan sulfate and collagen in the tissues of *S. plicata*

Dermatan sulfate was previously reported to be present in the extracellular matrix of various tissues of the ascidian *S. plicata* (Gandra et al., 2000). Collagen was also detected by determining the content of hydroxyproline in the body of this ascidian (Pavão et al., 1994). However, no description about the type and distribution of collagen among different tissues was reported. To compare the distribution of collagen and dermatan sulfate in *S. plicata*, we carefully isolated the intestine, heart, pharynx and mantle and measured the content of hydroxyproline in these tissues (Table 1). Collagen was detected in all tissues studied, occurring in high amounts in the heart, pharynx and mantle. In the intestine, it occurs in very low amounts. All tissues studied contain significant quantities of dermatan sulfate, which prevails in pharynx and mantle in a concentration similar to that of collagen (0.6–1.0µg/mg dry mass).

To determine the distribution collagen in the tissues of *S. plicata*, sections from intestine and pharynx were stained with Sirius red and observed with a confocal microscope or with an optic microscope under a polarized light (Fig. 1). Sirius red in the presence of picric acid is a selective reaction, namely picrosirius, which stains collagen producing an intense reddish color. A diffuse reddish material was detected throughout the extracellular matrix of pharynx and intestine sections, when observed by optic microscope under a polarized light (Fig. 1A, C and E). In the intestine, the reddish material was mostly detected close to the serosa membrane (Fig. 1E). A tri-dimensional analysis of pharynx and intestine sections by confocal microscopy provided the same pattern of distribution of the reddish material in the extracellular matrix and allowed the visualization of this material in the basal membrane (Fig. 1B, D and F). The green light represents the autofluorescence of the tissues.

4.2. Immunohistochemistry

Decorin is a typical dermatan sulfate/chondroitin sulfate proteoglycan of the extracellular matrix, which associates with fibril-like collagens, regulating their morphology. To investigate whether a decorin-like protein would be present in *S. plicata* and to localize it in the tissues of the ascidian, sections from

Table 1
Distribution of collagen and dermatan sulfate in the tissues of *S. plicata*

Tissues	Dermatan sulfate ^a (µg/mg dry tissue)	Collagen ^b (µg/mg dry tissue)	DS/Collagen
Intestine	0.2	0.1	2.0
Heart	0.1	1.0	0.1
Pharynx	1.0	0.6	1.7
Mantle	0.6	0.6	1.0

^a Values obtained from Gandra et al. (2000).

^b Collagen was estimated in the tissues by the content of hydroxyproline, according to Stegemann and Stalder (1967).

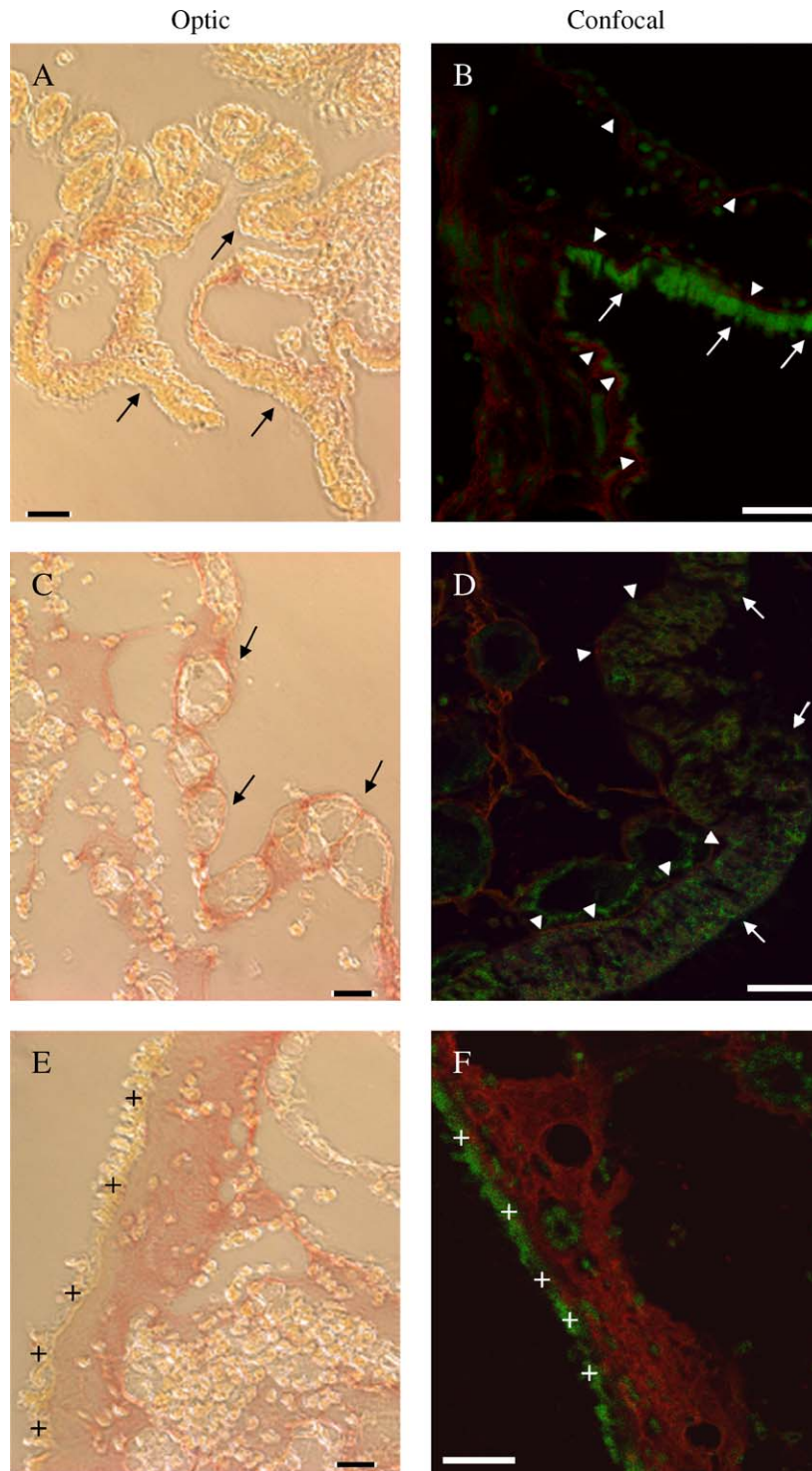


Fig. 1. Histochemistry with picosirius in the tissues of *S. plicata*. Sections from pharynx (A, B) and intestine (C–F) were treated with Sirius red and analyzed by optic (A, C, E) or confocal microscope (B, D, F), as described in Materials and methods. Arrows indicate epithelial cell layer, arrowheads indicate the basement membrane, and crosses the serosa membrane. The reddish material indicates positive reaction for collagen. The green color indicates intrinsic fluorescence. Bar=50 μ m.

intestine and pharynx were submitted to immunohistochemical analysis, using a polyclonal antibody raised against the peptide CEASGIGPEVPDDR from human decorin. An intense immunostaining was observed throughout the extracellular matrix in both pharynx and intestine (Fig. 2B and D). No positive staining was observed at the tip of epithelial cells or at

the basement membrane (Fig. 2B and D), as well as in control sections where the primary antibody was omitted (Fig. 2A and C). These results suggest the presence, in the extracellular matrix of intestine and pharynx of *S. plicata*, of a protein containing a decorin-specific peptide, which colocalizes with collagen.

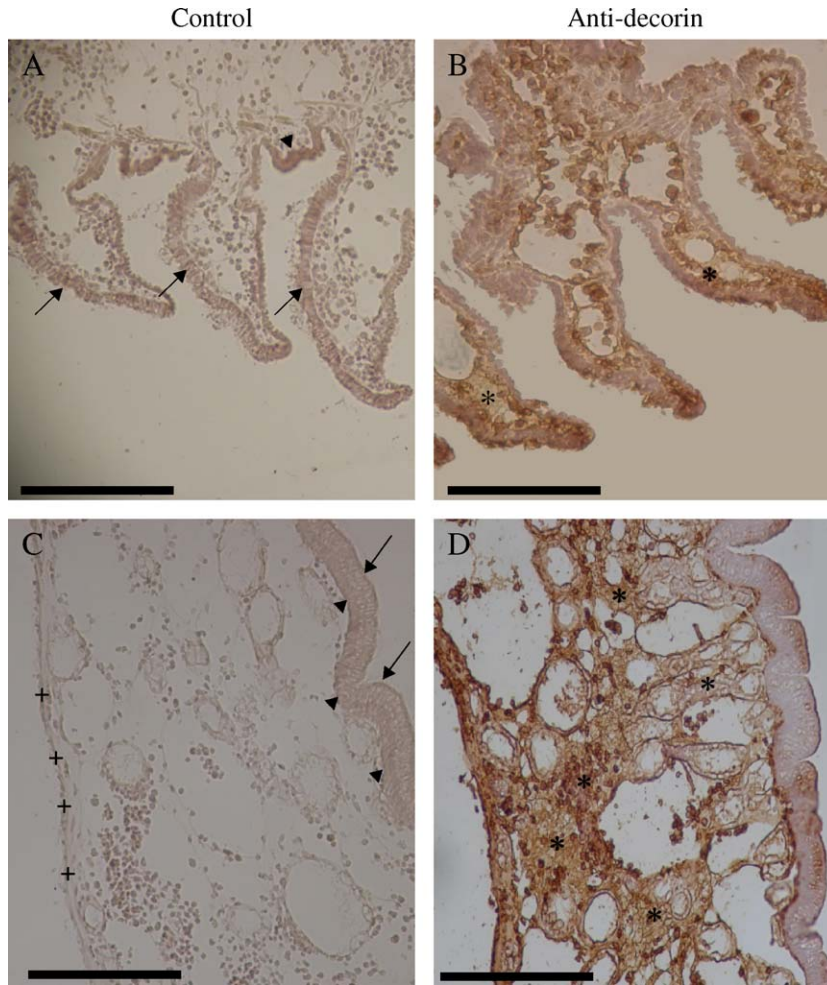


Fig. 2. Immunohistochemistry for decorin-specific peptide in the tissues of *S. plicata*. Sections from pharynx (A, B) and intestine (C, D) were treated with rabbit anti-human decorin-specific peptide antibody, as described in Materials and methods. Control was obtained omitting the primary antibody (A, C). Arrows indicate epithelial cell layer, arrowheads indicate the basement membrane, and crosses the serosa membrane. Asterisks indicate positive reaction. Bar=50 μ m.

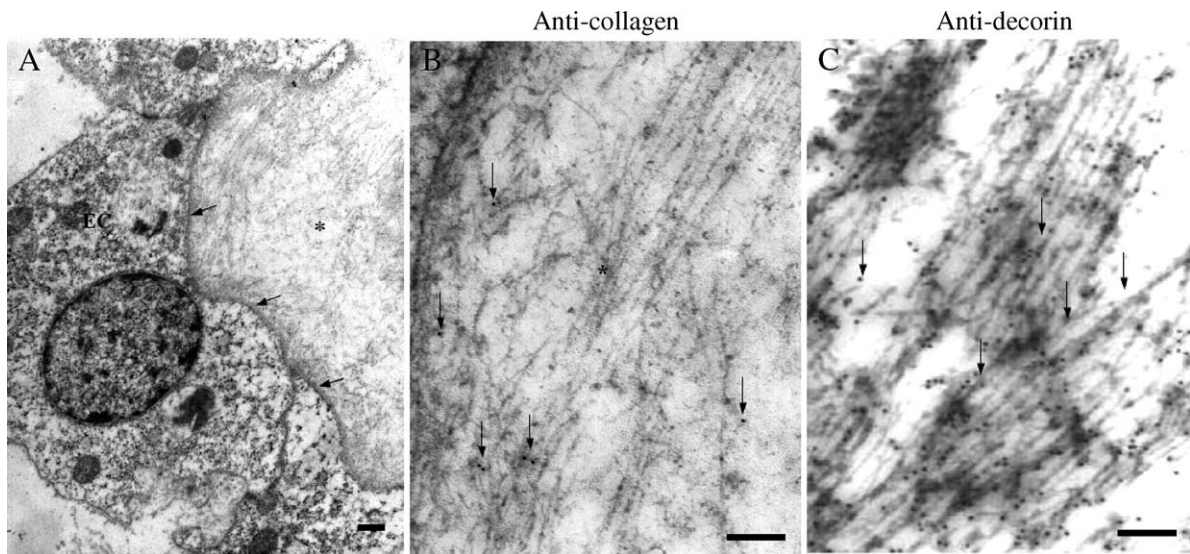


Fig. 3. Immunolocalization of decorin-specific peptide and collagen in the tissues of *S. plicata* by electron microscopy. Electron micrograph showing the epithelial cells (EC) supported by a basement membrane (arrows) and a fibrillar extracellular matrix (*) (A). The pattern of gold labeling for collagen type I (arrows in B) and for decorin-specific peptide (arrows in C) can be observed in the extracellular matrix. The localization of decorin-specific peptide and collagen type I was on the surface of fibrillar collagen-like material. Bar=150nm.

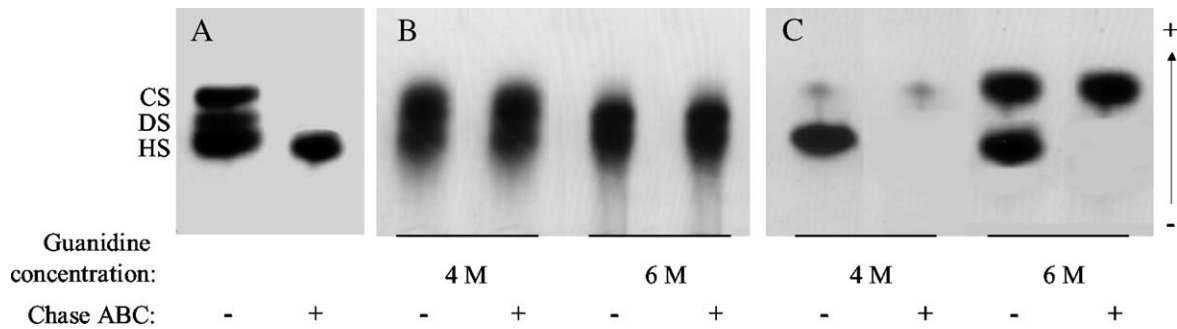


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the guanidine and papain extracts obtained from the viscera of *S. plicata*. 4M or 6M guanidine extracts (10 μ g) (B), the papain-treated residues of the 4M or 6M guanidine extracts (10 μ g) (C), as well as a mixture of standard glycosaminoglycans (A), containing 10 μ g each of chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS), before (–) and after (+) incubation with chondroitinase ABC (Chase ABC) were applied to a 0.5% agarose gel and run for 1 h at 110 V in 1,3-diaminopropane/acetate (pH 9.0). The glycosaminoglycans in the gel were fixed with 0.1% *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide solution. After 12 h, the gel was dried and stained with 0.1% toluidine blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5, v/v).

4.3. Immunoelectron microscopy

To further investigate the apparent co-localization of the protein containing the decorin-specific peptide and collagen, sections from pharynx were processed for electron microscopy. Polyclonal antibodies raised against collagen type I or against peptide CEASGIGPEVPDDR from human decorin were used followed by a gold-conjugated secondary antibody. Fig. 3A shows epithelial cells supported by a basement membrane adjacent to a fibril-rich extracellular matrix. After immuno-gold labeling with anti-type I collagen, 10-nm gold particles, representing positive reaction of the antigen–antibody complex, were detected all over the extracellular matrix on the fibrillar material (Fig. 3B). Similar results were observed when antibody against peptide CEASGIGPEVPDDR from human decorin was used. The gold particles were dispersed throughout the extracellular matrix, but only present on the same fibrillar material where anti-collagen antibodies were detected (Fig. 3C). No positive reaction was observed on the basement membrane or when both primary antibodies were omitted.

4.4. Analysis of the material extracted from the ascidian tissues with guanidine

In previous work (Gandra et al., 2000), dermatan sulfate was detected in the extracellular matrix of intestine and pharynx of *S. plicata*, showing a pattern of distribution similar to that of the decorin-like peptide observed in the present work (See Fig. 2). These results raise the possibility that a decorin-like proteoglycan is present in this ascidian. To further investigate this hypothesis, the viscera of *S. plicata* were submitted to extraction with guanidine hydrochloride and the guanidine extract was analyzed by Western blot, using the antibody against the decorin peptide CEASGIGPEVPDDR. No band was detected by the antibody in extracts obtained with 4M or 6M guanidine, suggesting that the ascidian decorin-like proteoglycan is resistant to extraction with chaotropic agents (data not shown). The same result was observed when the viscera was extracted with 8M urea.

Dermatan sulfate was the only galactosaminoglycan previously detected in *S. plicata* (Pavão et al., 1994, 1995, 1998;

Gandra et al., 2000; see Pavão, 2002, for a review). Therefore, we assumed that if a decorin-like proteoglycan is present in this ascidian, it should be glycosylated with dermatan sulfate chains. To confirm that dermatan sulfate is resistant to extraction with 4M and 6M guanidine, we analyzed the 4M and 6M guanidine extracts by agarose gel electrophoresis before and after incubation with chondroitinase ABC. As shown in Fig. 4B, no chondroitinase-sensitive metachromatic band was detected in these extracts, indicating that dermatan sulfate, probably linked to a protein core, remained in the residue. To verify that, the residue of the guanidine extracts were submitted to papain digestion and the material was analyzed by agarose gel electrophoresis before and after incubation with chondroitinase ABC. As shown in Fig. 4C, a chondroitinase-sensitive metachromatic band was detected in the 4M and 6M guanidine residues, indicating that dermatan sulfate is only solubilized from the ascidian tissues after incubation with proteases.

5. Discussion

Collagen was detected and localized in the tissues of the ascidian *S. plicata* by the dosage of hydroxyproline, a modified amino acid present typically in fibrillar collagen (Veis and George, 1994), and by selective staining with Sirius red and anti-type I collagen antibody. Collagen is present in the extracellular matrix of intestine and pharynx. In a previous work, sections from these organs were metachromatically stained with the cationic dye 1,9-dimethylmethylene blue and the metachromasia was completely removed from the extracellular matrix after treatment of the sections with chondroitinase ABC, indicating that galactosaminoglycan-like polymers were restricted to that location (Gandra et al., 2000). Since dermatan sulfate is the only galactosaminoglycan present in *S. plicata* (Pavão et al., 1994, 1995, 1998; Gandra et al., 2000; see Pavão, 2002 for a review), we can assume that the positive staining observed in the extracellular matrix after treatment with 1,9-dimethylmethylene blue (Gandra et al., 2000) is due to the occurrence of dermatan sulfate in the ascidian. According these previous results and to those of the present work, collagen colocalizes with

dermatan sulfate in the extracellular matrix of intestine and pharynx of *S. plicata*.

Decorin is a proteoglycan member of the SLRP family of proteins. The core protein of decorin contains a single chain of chondroitin/dermatan sulfate in its N-terminal domain (Iozzo, 1998). The antibody raised against the decorin-specific peptide CEASGIGPEVPDDR recognized similar epitopes in the tissues of *S. plicata*. The immunolocalization of the peptide displays a pattern of distribution similar to that of dermatan sulfate and collagen and is restricted to the extracellular matrix of intestine and pharynx, indicating that these molecules co-localize in these tissues. This result raises the possibility that the oversulfated dermatan sulfate, identified previously in *S. plicata* (Gandra et al., 2000), is linked to a protein bearing the decorin-specific peptide CEASGIGPEVPDDR, and that, in the case of this invertebrate, this protein is glycosylated only with oversulfated dermatan sulfate chains, since this is the only galactosaminoglycan present in this ascidian. However, these results do not exclude the existence of other proteoglycans with the same type of glycosaminoglycan chains in this invertebrate.

The resistance of the ascidian dermatan sulfate proteoglycans to extraction with chaotropic agents is worth to notice. Usually, dermatan sulfate proteoglycans such as decorin can be easily extracted from mammalian tissues with 4M guanidine (Andrade and Brandan, 1991; Sunwoo et al., 1998). However, high concentrations of guanidine hydrochloride or urea, that would normally abolish the interactions among extracellular matrix components, could not solubilize the dermatan sulfate proteoglycans from the ascidian tissues. The solubilization only occurred after the complete disruption of the extracellular matrix network with proteolytic digestion (Fig. 4), implying that very strong interactions may be required to maintain the structural integrity of the tissues. In marine invertebrates, the tissues are in close contact with the highly ionic strength environment of the sea water. As a consequence, molecules with high charge densities are usually found in these organisms, for example the oversulfated dermatan sulfates from ascidians (Pavão et al., 1995; Gandra et al., 2000), the fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumbers (Mourão et al., 1986), and the oversulfated chondroitin sulfates from sea squid (Karamanos et al., 1992; Kinoshita et al., 2001). As shown by electron microscopy (Fig. 3), the extracellular matrix of pharynx is formed by an intricate network of collagen fibrils, which in addition to the strong negative nature of the dermatan sulfate chains may contribute for the poor solubilization of dermatan sulfate proteoglycans.

Similar to bovine fibrocartilage, the ascidian decorin-like polymer contains glycosaminoglycan chains in which the majority of the uronate is iduronate (Scott et al., 1989a,b). However, whereas the sulfation pattern of the glycosaminoglycan chains of decorin varies in bovine tissues, in the ascidian *S. plicata*, the glycosaminoglycan chain is composed by a unique disaccharide unit, consisting of iduronic acid 2-sulfated, N-acetylgalactosamine 4-sulfated (Gandra et al., 2000).

Overall, this work describes the distribution of collagen in the primitive chordate *S. plicata* and the co-localization of

dermatan sulfate, a decorin-specific peptide and collagen in the tissues of this invertebrate.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, FAPERJ, and NIH Fogarty International Center (R03 TW05775). Mauro S.G. Pavão is a research fellow from CNPq.

References

- Ameys, L., Young, M.F., 2002. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12, 107R–116R.
- Andrade, W., Brandan, E., 1991. Isolation and characterization of rat skeletal muscle proteoglycan decorin and comparison with the human fibroblast decorin. *Comp. Biochem. Physiol. B* 100, 565–570.
- Brown, D.C., Vogel, K.G., 1989. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. *Matrix* 9, 468–478.
- Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E., Iozzo, R.V., 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* 136, 729–743.
- De Luca, A., Santra, M., Baldi, A., Giordano, A., Iozzo, R.V., 1996. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 18961–18965.
- Dolber, P.C., Spach, M.S., 1993. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 465–469.
- Gandra, M., Cavalcante, M.C.M., Pavão, M.S.G., 2000. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). *Glycobiology* 10, 1333–1340.
- Hedbom, E., Heinegard, D., 1993. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* 268, 27307–27312.
- Hocking, A.M., Shinomura, T., McQuillan, D.J., 1998. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17, 1–19.
- Iozzo, R.V., 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609–652.
- Iozzo, R.V., Moscatello, D.K., McQuillan, D.J., Eichstetter, I., 1999. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 4489–4492.
- Karamanos, N.K., Aletras, A.J., Tsegenidis, T., Tsiganos, C.P., Antonopoulos, C.A., 1992. Isolation, characterization and properties of the oversulfated chondroitin sulphate proteoglycan from squid skin with peculiar glycosaminoglycan sulphation pattern. *Eur. J. Biochem.* 204, 553–560.
- Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A., Iozzo, R.V., 2000. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 275, 21801–21804.
- Kinoshita, A., Yamada, S., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Sugahara, K., 2001. Isolation and structural determination of novel sulfated hexasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate E that exhibits neuroregulatory activities. *Biochemistry* 40, 12654–12665.
- Kresse, H., Schonherr, E., 2001. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.* 189, 266–274.
- Markmann, A., Hausser, H., Schonherr, E., Kresse, H., 2000. Influence of decorin expression on transforming growth factor- β -mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol.* 19, 631–636.
- Moscatello, D.K., Santra, M., Mann, D.M., McQuillan, D.J., Wong, A.J., Iozzo, R.V., 1998. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Invest.* 101, 406–412.
- Mourão, P.A.S., Pereira, M.S., Pavão, M.S.P., Mulloy, B., Tollefsen, D.M., Mowinckel, M., Abildgaard, U., 1986. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches of the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *J. Biol. Chem.* 271, 23973–23984.

- Pavão, M.S.G., 2002. Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74, 105–112.
- Pavão, M.S.G., Rodrigues, M.A., Mourão, P.A., 1994. Acidic polysaccharides of the ascidian *Styela plicata*. Biosynthetic studies on the sulfated L-galactans of the tunic, and preliminary characterization of a dermatan sulfate-like polymer in body tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 199, 229–237.
- Pavão, M.S.G., Mourão, P.A.S., Mulloy, B., Tollefsen, D.M., 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 270, 31027–31036.
- Pavão, M.S.G., Aiello, K.R.M., Werneck, C.C., da Silva, L.C.F., Valente, A.P., Mulloy, B., Clowell, N.S., Tollefsen, D.M., Mourão, P.A.S., 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 273, 27848–27857.
- Riquelme, C., Larrain, J., Schonherr, E., Henríquez, J.P., Kresse, H., Brandan, E., 2001. Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor β and accelerates skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 3589–3596.
- Schonherr, E., Hausser, H., Beavan, L., Kresse, H., 1995. Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains. *J. Biol. Chem.* 270, 8877–8883.
- Scott, J.E., 1996. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry* 35, 8795–8799.
- Scott, J.E., Haigh, M., Nusgens, B., Lapiere, C.M., 1989a. Proteoglycan: collagen interactions in dermatosparactic skin and tendon. An electron histochemical study using cupromeronic blue in a critical electrolyte concentration method. *Matrix* 9, 437–442.
- Scott, P.G., Nakano, T., Dodd, C.M., Pringle, G.A., Kuc, I.M., 1989b. Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. II. Low molecular weight dermatan sulphate proteoglycan. *Matrix* 9, 284–292.
- Scott, P.G., McEwan, P.A., Dodd, C.M., Bergmann, E.M., Bishop, P.N., Bella, J., 2004. Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15633–15638.
- Stegemann, H., Stalder, K., 1967. Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* 18, 267–273.
- Sunwoo, H.H., Nakano, T., Sim, J.S., 1998. Isolation and characterization of proteoglycans from growing antlers of wapiti (*Cervus elaphus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 120, 273–283.
- Takeushi, Y., Kodama, Y., Matsumoto, T., 1994. Bone matrix decorin binds transforming growth factor- β and enhances its bioactivity. *J. Biol. Chem.* 269, 32634–32638.
- Veis, A., George, A., 1994. Fundamentals of interstitial collagen self-assembly. *Extracellular Matrix Assembly*. Academic Press, NY.
- Vogel, K.G., Paulsson, M., Heinegard, D., 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* 223, 587–597.
- Weber, I.T., Harrison, R.W., Iozzo, R.V., 1996. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 31767–31770.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)