



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

ESTUDO COMPARATIVO DOS DIFERENTES
COMPONENTES DA ESPONJA DULCIAQUÍCOLA *Drulia*
***uruguayensis* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1968**
(PORIFERA: METANIIDAE) NA INDUÇÃO DE
ZOODERMATOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.

ALEXANDRE DE OLIVEIRA MAGALHÃES

MANAUS
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

ALEXANDRE DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**ESTUDO COMPARATIVO DOS DIFERENTES
COMPONENTES DA ESPONJA DULCIAQUÍCOLA *Drulia
uruguayensis* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1968
(PORIFERA: METANIIDAE) NA INDUÇÃO DE
ZODERMATOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “Diagnóstico e Controle” e na linha de pesquisa “Estratégias para o Controle e/ou Diagnóstico”.

Orientadora: **Prof^ª Doutora Maria Cristina dos Santos**

Co-orientadora: **Prof^ª Doutora Cecília Volkmer Ribeiro**

**MANAUS
2008**

Ficha catalográfica, elaborada pelo Bibliotecário Flaviano Lima de Queiroz
Diretor da Biblioteca Central/UFAM- CRB 11º/255

M188e Magalhães, Alexandre de Oliveira
 Estudo comparativo dos diferentes componentes da esponja
 Dulciaquícola *Drulia uruguayensis* Boneto & Ezcurra de Drago, 1968
(Porifera: Metaniidae) na indução de zoodermatose experimental em
camundongos / Alexandre de Oliveira Magalhães.- Manaus:
UFAM / Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical, 2008.
67 p. : il. ; 30 cm
Orientadora: Maria Cristina dos Santos
Co-orientadora: Cecília Volkmer Ribeiro

Dissertação (Mestrado) – UFAM / PPGPT, 2008.

1. Esponja 2. Dermatose 3. Cauixi 4. Lesões dermatológicas
5. Histopatologia I. Santos, Maria Cristina dos II. Ribeiro, Cecília
Volkmer III. Título.



CDU 616.514(043.3)
CDD 615.97

ALEXANDRE DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**ESTUDO COMPARATIVO DOS DIFERENTES
COMPONENTES DA ESPONJA DULCIAQUÍCOLA *Drulia
uruguayensis* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1968
(PORIFERA: METANIIDAE) NA INDUÇÃO DE
ZODERMATOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “Diagnóstico e Controle” e na linha de pesquisa “Estratégias para o Controle e/ou Diagnóstico”.

Aprovada, em 15 outubro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Doutora Maria Cristina dos Santos, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Doutora Tatiana Nayara Libório dos Santos, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Evandro Ribeiro, Membro Externo
Universidade do Estado do Amazonas



Aos meus pais **Renato** e **Astrid** que sempre
me apoiaram.
Ao meu filho **João**, que, com seu sorriso, me
deu calma e força no final desse trabalho.
À minha Esposa **LIDIANE**, sem a qual esse trabalho não
existiria. À minha orientadora Profa. Maria
Cristina, que acreditou no projeto desde o
início.



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Renato** e **Astrid**, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. **João Luiz Cardoso** pela inspiração do tema e pela sua confiança em mim para a sua execução.

À minha irmã **Renata** e tia **Lúcia** pelas fundamentais ajudas nos primeiros passos em Manaus.

À Profa Dra **Cecília Volkmer Ribeiro** cujo entusiasmo pelo projeto me deu forças para vencer muitos dos obstáculos surgidos.

Ao Prof. Dr. **José Fernando Marques Barcellos** que nunca mediu esforços para que o trabalho fosse realizado, tanto na questão material, quanto no incentivo pessoal. Meu mais sincero agradecimento, pelo amigo que ganhei e pelo exemplo pessoal de dedicação aos discentes, quer sejam da graduação ou da pós-graduação.

À Profa Dra **Maria Cristina dos Santos** pela paciência, incentivo e orientação durante todo o projeto.

À Profa Msc **Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto** pela orientação na análise histopatológica e pelas idéias dadas para tornar o trabalho mais claro.

Ao Prof. Dr. **Oscar Tadeu Ferreira da Costa** pela sua constante disposição em dirimir dúvidas surgidas e pelos eventuais usos de seu laboratório e equipamentos.

À Profa Dra **Claúdia Cândido Silva** pela ajuda na análise química das espículas.

À Profa Msc **Michella Bezerra Lima** pela ajuda e apoio na fase final da redação.

Ao Prof. **Antônio Luiz Ribeiro Boechat**, pelo auxílio providencial na finalização deste trabalho.

À **Universidade do Estado do Amazonas**, em especial à **Coordenação de Patologia da Escola Superior de Saúde**, cujo acolhimento e permissão de uso da sua infraestrutura laboratorial, foram vitais para o término deste projeto.

À Professora **Viviane**, coordenadora do Biotério Central da UEA, por disponibilizar o espaço e o material para acondicionar os animais experimentais antes do início dos testes.

À **Maria de Fátima Barbosa**, técnica do **Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal**, pelo auxílio na preparação dos blocos de parafina, microtomia e coloração histológica das lâminas.

Às técnicas do Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Amazonas, **Rose** e **Maísa** pela ajuda na confecção das primeiras lâminas histológicas.

Aos servidores **Wellington** e **Odiluz**, bioteristas, pela ajuda no cuidado com os animais experimentais no início do trabalho.

Às alunas de graduação **Ana Priscila Freitas Lemos** e **Iara Freski** que muito ajudaram em etapas distintas do trabalho.

À **Universidade Federal do Amazonas**, em especial aos professores do Instituto de Ciências Biológicas: Profa Msc **Maria Lúcia Góes**, Profa Msc **Cynthia Yamille**, Profa Dra **Janice Barros Monteiro**, Profa Dra **Aya Sadahiro**.

À **Risonilce F. S. Sousa**, bioterista do **Biotério Central do Instituto de Pesquisa da Amazônia**, pela solicitude incomum ao fornecer animais experimentais.

Aos agentes financiadores da pesquisa **Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM)** e a **CAPES** por meio do Programa Norte de Pesquisa e Pós-Graduação.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste projeto de dissertação de Mestrado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Esponjas são animais filtradores, fixados em pedras submersas e/ou galhos de árvores em locais de enchentes periódicas. As poríferas de água doce, conhecidas na região Amazônica como cauxi, cauxi ou cauí, são relatadas desde o início do século XX como causadoras de dermatose. Diferentemente das esponjas marinhas, que são estudadas de forma corrente em relação às suas propriedades biológicas, a química das esponjas dulciaquícolas, na Amazônia, não é conhecida, permanecendo aberta esta lacuna. Com o objetivo de determinar a parte da porífera que provoca a reação dermatológica, foi realizado um estudo experimental utilizando três formas de preparo de esponjas de água doce (esponjas íntegras, maceradas e suas espículas isoladas). Para o experimento foi utilizada a esponja dulciaquícola *Drulia uruguayensis*. O experimento foi dividido em duas fases: primeiro, foi determinada a cinética da dermatose causada pela esponja (utilizando a esponja macerada), tendo, como controle, esparadrapo microporoso hipoalérgico; e segundo, foram testados as outras duas formas de preparo: esponja íntegra e espículas isoladas, utilizando os horários de 2, 4 e 12 horas, provenientes da cinética. As células de ação comum em uma reação inflamatória (mastócitos, eosinófilos, neutrófilos) mais linfócitos intra-epiteliais e mastócitos degranulados, foram contados, para servir de parâmetro, a fim de determinar qual das formas de preparo das esponjas induziu maior reação. Estudo histopatológico avaliou os efeitos da esponja no tegumento. Os resultados obtidos, utilizando ANOVA fatorial, mostraram que a esponja íntegra provocou maior reação inflamatória ($p = 0,000005$) ativando, principalmente, mastócitos ($p = 0,0018$). A análise histopatológica mostrou pequena perda de continuidade da epiderme nas aplicações com espículas isoladas e esponja íntegra, e adelgaçamento na aplicação com esponja macerada, além de leve espessamento da epiderme no controle-esparadrapo. Esses achados permitem deduzir que, em um primeiro contato, a esponja estruturalmente íntegra, pode causar maior reação inflamatória pela sua capacidade de causar perfurações na pele e permitir a entrada de agentes inflamatórios. A esponja macerada, por não conseguir perfurar o tegumento, provocou adelgaçamento da epiderme com menor reação inflamatória, possivelmente por conter fragmentos rígidos e possíveis químicos não conhecidos. As espículas isoladas, limpas e autoclavadas, não causam reação dérmica, ficando seu papel restrito à ação mecânica. O estudo sugere o uso de esponjas íntegras, limpas e autoclavadas, para verificar a manutenção da capacidade de induzir dermatose. Além do uso dos outros componentes da esponja para verificar a participação destes na reação inflamatória.

Palavras-chave: cauxi, dermatose, *Drulia uruguayensis*, esponja de água-doce, porífera

ABSTRACT

Sponges are filter animals fixed in stones submerged and/or on branches of trees in places of periodical floods. The freshwater poriferans, known in the Amazon region as cauixi, cauxi or cauí, are reported from the beginning of the twentieth century as causing dermatosis. Differently from marine sponges, which are studied in a such relation to their biological properties, the chemistry of freshwater sponges in the Amazon region, are not known, this way this gap still open to research. With the objective to define which part of the poriferan is causing the dermatological reaction, it was done an experimental study using three forms of tillage freshwater sponges (sponges undamaged, macerated and the isolated spikes). To perform the experiment was used the freshwater Sponge *Drulia uruguayensis*. The experiment was divided in two stages: The first one, was to determine the kinetics of dermatosis caused by sponge (using a macerating sponge), obtaining as control, a hypoallergenic microporous plaster; as second action, were tested the other two forms of process: full sponge and isolated spikes using the schedules 2, 4 and 12 hours came from kinetics. The cells of common action in an inflammatory reaction (mast cells, eosinophils, neutrophils) more intra-epithelial lymphocytes and degranulated mastocytes, were counted, to serve as a parameter, in order to determine which of the forms of trim induced a higher reaction of sponges. Histopathological studies evaluated the effects of the sponge in the tegument. The results obtained by ANOVA, showed that the full sponge caused more inflammatory reaction ($p = 0.000005$) stimulating mainly, the mastocytes ($p = 0.0018$). The Histopathological analysis showed small loss of continuity of the epidermis in applications with isolated spikes and full sponge, and streamlining in the application with macerating sponge besides the mild thickening on the epidermis in the plaster control. These studies allow to deduce that, in a first contact, a full structurally sponge, may cause major inflammatory reaction by its capacity to cause drilling in the skin and allowing the entrance of inflammatory agents. The macerating sponge, does not achieve bore the tegument, caused streamlining of the epidermis with lower inflammatory reaction, possibly by containing rigid fragments and possible by unknown chemical process. The isolated spikes, cleaned and autoclaved, do not cause dermal reaction resulting the activity in a restricted mechanical action. The studies suggests the using of undamaged sponges, cleaned and autoclaved to verify the maintenance of the capacity to induce dermatosis, beyond the use of the other parts of sponges to verify the participation of these components in the inflammatory reaction.

Keywords: cauixi, dermatosis, *Drulia uruguayensis*, freshwater sponge, poriferans

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Possíveis mecanismos indutores de lesão dérmica provocados pelas esponjas marinhas segundo os autores.....	24
Quadro 2	As médias e desvios-padrões obtidos nos grupos e utilizados na montagem dos gráficos de cinética.....	42
Quadro 3	As médias e desvios-padrões utilizados na montagem dos gráficos do experimento com as formas de preparo das esponjas íntegra, espículas isoladas e esponjas maceradas.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de p nas relações entre o tipo de aplicação e as células usadas com parâmetro, assim como entre as formas de aplicação. $p < 0,05$	49
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coleta da esponja <i>Drulia uruguayensis</i> . A área de coleta está circundada por um círculo.....	29
Figura 2	Preparo dos animais experimentais. A) Tricotomia parcial da região dorso-anterior dos camundongos; B) Aplicação de esponja íntegra na região tricotomizada e C) Local da retirada de parte da pele do animal anestesiado, que recebeu a aplicação do material. Tanto nos camundongos controle quanto nos testes, foi realizado o mesmo procedimento.....	34
Figura 3	As esponjas coletadas na Praia do Aramanaí, município de Belterra, Pará (A), foram separadas (B) pela comparação com os exemplares provenientes do Museu Natural da Fundação Zoobotânica de Porto Alegre (RS) (C).....	40
Figura 4	Retirada do resíduo dissolvido pelo ácido clorídrico P.A.: A) Aspecto do material antes da remoção dos resíduos; B) Retirada do material dissolvido com pipeta Pasteur de plástico - observar o “pelet” de espículas no fundo do tubo e C) Aspecto do material após a remoção dos resíduos.....	40
Figura 5	Separação de grãos de areia ainda presentes no pelet de espículas.....	41
Figura 6	Aspecto final das espículas isoladas antes (A) da secagem em estufa (B). C) Espículas prontas para serem acondicionadas em béquer de plástico e guardadas em freezer.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Cinética de mastócitos e mastócitos degranulados (A); e eosinófilos, neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais (B) na dermatose induzida pela esponja de água doce <i>Drulia uruguayensis</i> utilizando seu preparo por maceração. O valor zero, no eixo das horas, representa a quantidade da célula no animal normal 48 horas após a tricotomia.....	43
Gráfico 2	Cinética dos mastócitos e mastócitos degranulados (A) e eosinófilos, neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais (B) utilizando esparadrapo como controle. O valor zero, no eixo das horas, representa a quantidade da célula no animal normal 48 horas após a tricotomia.....	44
Gráfico 3A	Gráfico comparativo demonstrando a quantidade máxima de células por material utilizado e horários de pico. O gráfico acima mostra o comportamento de mastócitos e mastócitos degranulados.....	50
Gráfico 3B	Gráfico comparativo demonstrando a quantidade máxima de células por material utilizado e horários de pico. O gráfico acima mostra o comportamento de eosinófilos, , neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais.....	52
Gráfico 4	Gráfico mostrando a relação entre a esponja na forma íntegra e a variação do número de células, com $p < 0,05$	53
Gráfico 5	Gráfico mostrando a relação entre o tipo de aplicação e a linhagem celular, com $p < 0,05$	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
10X	Número de aumentos das oculares e objetivas
AM	Amazonas
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ATM	Atmosfera
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
CpG	Oligonucleotídeo Citocina Fosfato Guanina
CXCL-8	Citosina IL-8
ED-XRF	Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia
g	Gramma
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
HT29	Adenocarcinoma do cólon humano
IL	Interleucina
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia
KeV	Kiloeletron-volt
L	Litro
LAPEC	Laboratório de Análise de Combustíveis
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligramma

ml	Militro
mm	Milímetros
mm ²	Milímetro quadrado
NCI-h460	Carcinoma pulmonar de células grandes
Nº	número
° C	Graus Celsius
PA	Para Análise
Poli-APS	Polímeros de 3-alquilpiridinium
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações Por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
SiO ₂ .nH ₂ O	Sílica Hidratada Amorfa
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante beta
U373	Astrocitoma glioblastoma humano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	ORIGEM, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DAS ESPONJAS.....	16
1.2	<i>Drulia uruguayensis</i>	19
1.3	COMPONENTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS ESPONJAS.....	20
1.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS CAUSADAS PELOS EXTRATOS DE ESPONJAS.....	21
1.5	SINAIS E SINTOMAS CAUSADOS PELO CONTATO COM AS ESPONJAS MARINHAS.....	22
1.6	SINAIS E SINTOMAS CAUSADOS PELO CONTATO COM AS ESPONJAS DULCIAQUÍCOLAS.....	23
1.7	JUSTIFICATIVA.....	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	ESPONJAS.....	29
3.1.1	Coleta	29
3.1.2	Escolha das esponjas	29
3.1.3	Classificação taxonômica	30
3.1.4	Preparo das esponjas para realização dos experimentos	30
3.1.4.1	Íntegra.....	30
3.1.4.2	Macerada.....	30
3.1.4.3	Espículas isoladas.....	30
3.1.5	Análise química das espículas purificadas	32
3.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	32
3.2.1	Animais	33
3.2.2	Preparo dos animais para realização dos experimentos	33

3.2.3	Obtenção da cinética da dermatose.....	33
3.2.4	Teste da reação tegumentar para as formas preparadas com esponjas íntegras e espículas isoladas.....	34
3.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E DIAGNÓSTICO SOBRE OS TEGUMENTOS.....	35
3.3.1	Organização dos fragmentos de pele para preparo dos blocos de parafina.....	35
3.3.1.1	Do experimento de cinética (esponja macerada).....	35
3.3.1.2	Do experimento utilizando esponjas íntegras e espículas isoladas.....	36
3.3.1.3	Preparo das lâminas histológicas.....	37
3.3.2	Contagem das células.....	37
3.3.3	Análise estatística.....	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1	ESPONJAS.....	39
4.2	RENDIMENTO DAS ESPÍCULAS ISOLADAS.....	39
4.3	ANÁLISE QUÍMICA DAS ESPÍCULAS PURIFICADAS.....	40
4.4	CINÉTICA DA DERMATOSE (ESPONJA MACERADA).....	41
4.5	COMPARAÇÃO DA INDUÇÃO DE DERMATOSE PELAS TRÊS FORMAS DE PREPARO DE ESPONJAS (MACERADA, ÍNTEGRA E ESPÍCULAS ISOLADAS).....	47
4.6	ASPECTO HISTOPATOLÓGICO CAUSADO PELAS FORMAS DE PREPARO DE ESPONJAS (MACERADA, ÍNTEGRA E ESPÍCULAS ISOLADAS).....	54
4.6.1	Controle normal.....	54
4.6.1.1	Duas horas.....	54
4.6.1.2	Quatro horas.....	54
4.6.1.3	Doze horas.....	54
4.6.2	Controle esparadrapo.....	55
4.6.2.1	Duas horas.....	55
4.6.2.2	Quatro horas.....	55
4.6.2.3	Doze horas.....	55
4.6.3	Esponja macerada.....	56
4.6.3.1	Duas horas.....	56
4.6.3.2	Quatro horas.....	56
4.6.3.3	Doze horas.....	56
4.6.4	Esponja íntegra.....	57
4.6.4.1	Duas horas.....	57
4.6.4.2	Quatro horas.....	57
4.6.4.3	Doze horas.....	57
4.6.5	Espículas isoladas.....	58
4.6.5.1	Duas horas.....	58
4.6.5.2	Quatro horas.....	58
4.6.5.3	Doze horas.....	58

5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
	APÊNDICE.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. ORIGEM, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DAS ESPONJAS.

As esponjas dulciaquícolas e as marinhas pertencem ao filo PORIFERA (do latim *porus*, poro + *fera*, portador de). Atualmente, já foram descritas cerca de 15.000 espécies, das quais, apenas 1% habita ambientes de água doce (BELARBI, 2003). As esponjas são organismos multicelulares primitivos, sésseis, encontrados, geralmente, fixos a substratos (STORER, 2002).

Das três classes do filo PORIFERA: Calcarea BOWERBANK, 1864, Hexactinellida SCHMIDT, 1870 e Demospongiae SOLLAS, 1885, apenas os representantes da última classe se adaptaram às águas doces. As três famílias de esponjas continentais com a maior diversidade de espécies e distribuição geográfica são: Metaniidae VOLKMER-RIBEIRO, 1986, Potamolepidae BRIEN, 1967 e Spongillidae GRAY, 1867, com ampla distribuição na região Neotropical, ocupando ambientes característicos (MANCONI; PRONZATO, 2008; VOLKMER-RIBEIRO, 1981, 1999).

As esponjas se desenvolveram durante a era Neoproterozóica (cerca de 1000 a 532 milhões de anos) (MÜLLER, 1998 apud MÜLLER et al., 2006) e se separaram dos outros metazoários aproximadamente a 650 milhões de anos (SCHÄCKE, 1994 apud MÜLLER et al., 2006). Com as alterações geológicas que se seguiram, principalmente no Cretáceo,

ocorreu uma invasão continental pelos oceanos. Os grandes mares interiores foram formados ao longo de várias Eras e, dessa forma, as esponjas invadiram os novos ambientes (VOLKMER-RIBEIRO; ROSA-BARBOSA, 1979; VOLKMER-RIBEIRO; PAULS, 2000). Com o recuo definitivo das águas, foram formados os grandes lagos salinos que, ao longo de milhares de anos, se desalinizaram pelo fluxo contínuo de água doce, proveniente dos rios que desembocavam em tais lagos. Isto permitiu que as esponjas tivessem o tempo necessário para se adaptarem à nova condição ambiental. Em uma nova etapa da seleção natural, as esponjas com capacidade de formar gêmulas constituíam a grande maioria, o que garantiu a passagem de um ambiente de lagos para os rios de água corrente e, a seguir, para ambientes de inundação temporária (VOLKMER-RIBEIRO; PAULS, 2000).

As esponjas obtêm seus alimentos por meio de um eficiente sistema de filtragem o qual retém plânctons, bactérias e pequenas partículas orgânicas. Não possuem tecidos verdadeiros ou sistemas de órgãos e apresentam certo grau de independência (STORER, 2002).

As esponjas são formadas por poucos tipos de células, algumas com movimentos amebóides. Estas incluem: os pinacócitos, que são células de revestimento externo (pinacoderme externa) e, também, interno (pinacoderme interna) nos locais onde não há cobertura por parte dos coanócitos (coanoderme). Estas últimas são células fagocitárias que possuem um flagelo no centro do seu pólo apical. Este flagelo gera um fluxo contínuo da água adjacente que passa através de 35 microvilosidades, cuja forma em paliçada ao redor do flagelo permite a filtração dos nutrientes da esponja. As partículas retidas descem até a base das microvilosidades e são fagocitadas, enquanto proteínas dissolvidas sofrem pinocitose. Os pinacócitos também são fagocitários, mantendo livre de microorganismos a parede da esponja (KUKENTHAL, 1986).

Os colêncitos produzem fibra colágena e substância fundamental

(mucopolissacarídeo) que formam o mesohilo. Este tecido gelatinoso abriga outras células com funções distintas, tais como os miócitos, responsáveis pela capacidade contrátil do tecido; os trofócitos que processam e distribuem o alimento capturado pelos coanócitos às outras células e os arqueócitos, que são células indiferenciadas. Os espongiócitos são células existentes nas esponjas silicosas que produzem o colágeno, denominado espongina, que serve para unir as espículas entre si (KUKENTHAL, 1986).

As espículas, produzidas pelos esclerócitos, compõem o esqueleto de sustentação das populações de células das esponjas. Estas podem ser de carbonato de cálcio (CaCO_3) ou formados por sílica hidratada amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (MÜLLER et al., 2005; URIZ, 2006).

As espículas das esponjas de água doce são silicosas e de muitos tipos, tamanhos e formas, constituindo os elementos primordiais para a sistemática do grupo. Porém, alguns autores mencionam que os caracteres morfológicos e esqueléticos são insuficientes para o estudo filogenético do grupo. Por isso, vários caracteres não-tradicionais como: a presença de metabólitos secundários, seqüência molecular, características embrionárias e citológicas, estão sendo avaliados, em pesquisas recentes, para auxiliar no estudo taxonômico e filogenético das esponjas (MEIXNER et al., 2007; REDMOND et al., 2007).

As espículas maiores ou megascleras constituem o retículo, que formam o esqueleto e que conferem certa rigidez ao animal, e estão divididas em duas categorias de tamanhos: megascleras alfa e beta. Espículas diminutas, denominadas microscleras, são ainda encontradas no pinacoderma. A maioria dessas esponjas forma corpos de resistência, chamadas de gêmulas, que possuem, em seu interior, células totipotentes que clonam novos indivíduos quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis. Para maior proteção, a gêmula é coberta por uma capa de espongina incrustada de pequenas espículas ou escleras, as gemoscleras (VOLKMER-RIBEIRO; PAULS, 2000).

Por seu aspecto fisiológico (animais filtradores) e estrutural (esqueleto de sílica), as

esponjas influenciam diretamente o ambiente em que se encontram. Ao reter sílica para constituir seu esqueleto, as esponjas podem influenciar o crescimento de uma espécie em detrimento de outra - por exemplo, o predomínio de uma alga *Desmidia* unicelular sobre as diatomáceas - (MELÃO, 1999). As esponjas podem, ainda, contribuir para a eliminação de bactérias patogênicas como a *Escherichia coli* (MADRID, 1967 apud VOLKMER-RIBEIRO, 1999).

Os conhecimentos taxonômicos e do habitat das esponjas de água doce, da Região Neotropical, vêm propiciando aplicações em diversas ciências ambientais, como indicadores de águas em condições naturais, de habitat ou ecossistemas e paleontológicos, devido à resistência das espículas, principalmente, em ecossistemas lacustres (BATISTA, 2007).

1.2. *DRULIA URUGUAYENSIS*

A espécie *Drulia uruguayensis* é endêmica na América do Sul, tendo seu primeiro registro feito para o Rio Uruguay (EZCURRA-DE-DRAGO, 1975 apud VOLKMER-RIBEIRO; TAVARES, 1993). Esta espécie foi identificada por Volkmer-Ribeiro e Tavares, em 1993, nas Praias Vermelha e do Arariá, a margem direita do rio Tapajós, Estado do Pará, Brasil.

Drulia uruguayensis possui cerca de vinte e cinco milímetros de espessura, quando sobre pedras. Nos galhos submersos, são esféricas. A sua consistência, quando seca, é frágil e quebradiça. Partindo da base, se projeta vertical ou radialmente de forma arborescente, o esqueleto formando malhas bem abertas. As gêmulas são encontradas em pacotes na base da esponja, próxima ao substrato. Na maioria dos espécimes, as gêmulas são abundantes e nitidamente visíveis através do esqueleto aberto da esponja (VOLKMER-RIBEIRO; TAVARES, 1995).

As espículas que formam o esqueleto da espécie *Drulia uruguayensis* são classificadas

como: a) Megascleras alfa (espículas lisas e afiladas): possuem comprimento variando de 312,8 a 818,8 μm e largura de 13,8 a 55,2 μm ; b) Megascleras beta (espículas lisas ou espinhentas com extremidades também afiladas): são abundantes, formam as cápsulas das gêmulas e possuem comprimento variando de 145,3 a 391,0 μm e largura de 13,8 a 45,1 μm ; c) Microscleras (muito delgadas e retas): tem dimensões variando de 17,0 a 80,0 μm de comprimento e 1,1 a 4,0 μm de largura; e d) Gemoscleras podem, eventualmente, existir duas categorias: uma que é sempre presente, medindo 19,6 a 32,1 μm de diâmetro e outra com dimensões variando de 75,4 a 96,0 μm de comprimento e 5,9 a 8,1 μm de largura (VOLKMER-RIBEIRO; TAVARES, 1995).

1.3. COMPONENTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS ESPONJAS.

Produtos com atividades biológicas produzidos pelas esponjas marinhas foram bem documentados na literatura, inclusive para as espécies encontradas na costa brasileira, tais como: a halitoxina, alcalóide alquilpiridina extraído da esponja *Amphimedon viridis*, que induziu atividade antibacteriana, antifúngica (MURICY et al., 1993), hemolítica, citotóxica, antimetabólica, neurotóxica e letal (BERLINCK et al., 1996); a 1,3-Dimetilisoguanina, purina isolada também da espécie *A. viridis*, que promoveu aumento da contração, por estimulação do plexo mioentérico, do músculo longitudinal do trato gastrointestinal de cobaias (CHEHADE et al., 1997); e os alcalóides, isolados da esponja marinha *Arenosclera brasiliensis*, arenosclerina A, B, C e a haliclonaciclamina E (TORRES et al., 2000). Estes alcalóides apresentaram atividades: citotóxica, contra células de linhagem cancerígena, e antibacteriana – inclusive para linhagens de *Staphylococcus aureus*, bactérias antibiótico-resistente (TORRES et al., 2002).

Cerca de 30 e 50 compostos constituídos por 3-alquilpiridinium e 3-alquilpiridina, respectivamente, com diferenças estruturais, foram isolados de esponjas marinhas da Ordem

Haplosclerida. Esses compostos servem como marcadores químicos para a determinação das esponjas, dessa Ordem. Sais poliméricos de 3-alkilpiridinium (poli-APS), isolados da esponja marinha *Reniera sarai*, apresentaram amplo espectro de atividades biológicas. A mais importante atividade induzida pelo poli-APS foi a inibição da acetilcolinesterase. Essa inibição foi observada com concentrações baixas do poli-APS, pois, em altas concentrações, induziu hemólise e agregação plaquetária (TURK; FRANGEZ; SEPCIC, 2007).

1.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS CAUSADAS PELOS EXTRATOS DE ESPONJAS.

Além dos componentes isolados, bioensaios com extratos de esponjas marinhas foram utilizados para verificação de atividades biológicas. No Brasil, Monks e colaboradores (2002) analisaram os efeitos biológicos de dez esponjas marinhas e em quatro esponjas (*Polymastia janeirensis*, *Haliclona aff tubifera*, *Mycale arcuiris* e *Raspailia (syringella) sp.*) observaram ação citotóxica para três linhagens de células tumorais humanas: HT29 – adenocarcinoma do colón humano, U373 – astrocitoma glioblastoma humano e NCI-H460 – carcinoma pulmonar de células grandes. Os extratos das esponjas *Polymastia janeirensis*, *Mycale arcuiris*, *Raspailia (syringella) sp.*, *Guitarra sp.*, *Tedania ignis* e *Pseudaxinella reticulata* apresentaram atividades antiqumiotáticas. As espécies *Axinella corrugata* e *H. aff tubifera* apresentaram atividade antibacteriana e, nove espécies de esponjas, demonstraram efeito antifúngico. Rangel e colaboradores (2001) ao estudarem extratos de 24 esponjas para as atividades antimitótica (citotóxica), hemolítica e neurotóxica, constataram que, dessas, 13 (54%) induziram de moderada a forte toxicidade. As espécies *Amphimedon sp.*, *Arenosclera brasiliensis* e *Geodia corticostylifera* apresentaram forte atividade hemolítica; as espécies *Aaptos sp.*, *A. brasiliensis*, *G. corticostylifera*, *Axinella corrugata*, *Mycale laxissima* e *Raspailia elegans*, atividade citotóxica; e *A. brasiliensis*, *G. corticostylifera*, *G. gibberosa* e *Stelletta sp.*, atividade neurotóxica. Em outro bioensaio, os extratos das espécies *Geodia*

corticostylifera, *Monanchora arbuscula* e *Amphimedon compressa* apresentaram potentes atividades antimetabólica, antiproliferativa e hemolítica (FERREIRA et al., 2007).

1.5. SINAIS E SINTOMAS CAUSADOS PELO CONTATO COM AS ESPONJAS MARINHAS.

Existem poucos relatos científicos sobre acidentes com esponjas marinhas ou de água doce. Isbister e Hooper (2005) realizaram ampla revisão bibliográfica, sobre os sinais e sintomas causados pelo contato com esponjas marinhas, da qual foram extraídos alguns exemplos. Das esponjas marinhas identificadas pelos autores como lesivas à pele, as espécies *Tedania ignis* (esponja de fogo), *T. nigrescens* e *T. anhelans* provocam, após o contato inicial, prurido e dolorosa irritação local. Esses sinais e sintomas persistem de 15 minutos a 24 horas. Em alguns casos, surgiram como reação tardia: dor, prurido, eritema, edema, bolhas e descamação. Os casos de dermatose causados pela *Tedania* sp. foram relatados em regiões da Índia Ocidental, Estados Unidos e Australásia. Em dois acidentes causados por *Tedania* sp. foram observados os seguintes sinais clínicos: rigidez nas pontas dos dedos, eritema, prurido, ardência e dor local. Sintomatologia semelhante foi observada para os pacientes acidentados com a esponja vermelha, *Microciona prolifera*, que ocorre nos Estados Unidos e induz eritema, edema associados com rigidez das articulações, podendo surgir bolha. Tais lesões podem permanecer durante meses.

A esponja da Austrália do Sul, *Neofibularia mordens*, por sua vez, induz irritação local, sensação de fragmentos de vidro no local afetado, evoluindo para prurido e dor severa, associados com eritema e edema. Esses sintomas duram de dias a semanas e raramente ocorre descamação (ISBISTER; HOOPER, 2005).

Na América do Norte, acidentados com a espécie *Fibula nolitangere* apresentaram dor local e edema, cerca de uma hora após o contato. Para a esponja *Biemna saucia*, espécie

oriunda da região da Austrália do Norte, os sinais e sintomas iniciais são eritema e dor local, que podem permanecer por duas horas, após contato. Esses sinais são seguidos de grave dermatite - inflamação com forte prurido, inchaço e dor no local afetado - que persiste por várias horas. Já, os pacientes acidentados pela espécie *Haliclona* sp. apresentaram, apenas, intensa irritação local (ISBISTER; HOOPER, 2005).

Outros autores, também, relataram sinais clínicos tais como: edema, prurido, eritema, vesículas, rigidez, principalmente próxima às articulações, descamação da pele e dor, apresentados pelos pacientes, após contato com as esponjas marinhas (BURKE, 1997; ROSSON; TOLLE, 1989; THOMAS; SCOTT, 1997). Além desses sinais e sintomas locais, podem ocorrer manifestações sistêmicas tais como: febre, arrepios, tontura, náusea, mal-estar e câimbras musculares, quando grande extensão de pele entra em contato com esponjas (BURKE, 2002; THOMAS; SCOTT, 1997). Tais sintomas surgem poucos minutos após o contato e podem durar vários meses (BURKE, 2002; BURNETT, CALTON; MORGAN, 1987). Reações alérgicas podem surgir uma semana a dez dias, após o contato (THOMAS; SCOTT, 1997). O quadro 1 mostra, de acordo com os autores, os possíveis mecanismos indutores de lesões dérmicas das esponjas marinhas.

1.6. SINAIS E SINTOMAS CAUSADOS PELO CONTATO COM AS ESPONJAS DULCIAQUÍCOLAS.

Vinte gêneros e quarenta e quatro espécies de esponjas continentais foram registrados para o Brasil, das quais, as mais estudadas, são as encontradas na Região Amazônica. Na Amazônia, as esponjas dulciaquícolas são conhecidas, popularmente, com o nome indígena de cauxi, cauxi ou cauí (BRAZIL, 1938; MATTA, 1934; VOLKMER-RIBEIRO, 1999). Segundo Matta (1934), o vocábulo se origina do guarani *acai*, queimar-se, que derivou em *cai*, queimadura. Já o termo *cauicy*, é formado por duas palavras da língua nheengatú, ou tupi

Autor	Tipo de Reação	Mecanismo da Lesão	Esponjas Marinhas Causadoras	Local
Burnett; Calton; Morgan, 1987	Dermatite de Contato	Toxinas na superfície da esponja.	<i>Tedania ignis</i> , <i>Fibula nolitangere</i> , <i>Microciona prolifera</i>	Hawai (EUA) e Ilhas do Caribe
Rosson; Tolle, 1989	Dermatite de Contato	Devido às toxinas não identificadas produzidas pelas esponjas.	*	Flórida e Hawai (EUA)
	Dermatite Irritante	Devido à fixação das espículas na pele.		
Thomas; Scott, 1997	Injúrias na pele**	1) As espículas penetram na pele causando pequeno ferimento. A lesão umenta se toxinas da esponja penetram na pele por esse ferimento (grifo nosso). 2) Contato direto com substâncias químicas presentes na superfície das esponjas.	<i>Tedania ignis</i>	Hawai, EUA
Burke, 2002	Dermatite	Toxinas na camada externa ganham a derme pelo dano na epiderme causado pelas espículas.	<i>Tedania ignis</i> , <i>Fibula nolitangere</i> , <i>Microciona prolifera</i> , <i>Haliclona viridis</i> , <i>Neofibularia mordens</i> , <i>Myrmekioderma styx</i> , <i>Stelletta clarella</i> , <i>Lissodendoryx</i> sp. e <i>Suberites inconstans</i>	***

Quadro 1 – Possíveis mecanismos indutores de lesão dérmica provocados pelas esponjas marinhas segundo os autores.

* Espécies não informadas pelos autores

** Definição dada pelo autor

*** Local não informado pelo autor

guarani. Cauí significa coceira e cy mãe, ou mãe da coceira (BRAZIL, 1938).

Durante o longo período de convivência de populações indígenas com as esponjas, na Região Amazônica, devido, sobretudo, à abundância dessa fauna nessa região, as espículas silicosas foram deliberadamente utilizadas como antiplástico na confecção de utensílios de cerâmicas (BRAZIL, 1938; GOMES, 2005; HILBERT, 1955; MACHADO, 1947; MATTA, 1934) a fim de evitar rachaduras, do material, durante o cozimento. O uso das espículas, no fabrico das cerâmicas, causava lesões dérmicas que foram notadas em oleiras indígenas Carajás, por Machado, em 1947, em expedição à região da Ilha do Bananal, Estado do Tocantins, Brasil. Possivelmente, o primeiro relato de lesão tegumentar, no Brasil, foi registrado por Matta (1932), ao descrever um acidente com um trabalhador do transporte de madeira, no Rio Solimões. O paciente relatou ter entrado em um igarapé quase sem corrente para empurrar um tronco de madeira. Ao tocar o tronco com as mãos espalmadas, e com força, sentiu ardência e prurido. Ao tentar lavar as mãos na água para abrandar a dor, ocorreu piora deste sinal, sendo advertido, no mesmo instante, por companheiro amazônida, de que ali havia *cauxi*. Após seis horas do contato com a esponja, o paciente tinha os “dedos e regiões palmares com rubefacção intensiva, que ia em progressão decrescente até o terço superior da face anterior dos antebraços” (MATTA, 1932).

Na literatura consultada, as esponjas de água-doce, responsáveis por acidentes, pertencem aos gêneros *Ephydatia* sp., *Drulia* sp. e *Lissodendoryx* sp. As espécies do gênero *Ephydatia* provocam prurido local e vermelhidão que podem persistir por uma a duas horas, após o contato (ISBISTER; HOOPER, 2005, MAGALHÃES et al., 2006, VOLKMER-RIBEIRO et al., 2006, VOLKMER-RIBEIRO; BATISTA, 2007). Para as esponjas do gênero *Drulia* sp., pertencentes à família Metaniidae, já foram relatados acidentes que apresentaram dermatoses (MAGALHÃES et al., 2006), e outros de graves lesões oculares (VOLKMER-RIBEIRO; BATISTA, 2007). As lesões oculares foram observadas em banhistas, que ao

mergulharem de olhos abertos no Rio Araguaia, (Araguatins, Estado do Tocantins), entraram em contato com espículas das espécies *Drulia uruguayensis* e *D. ctenosclera*. (VOLKMER-RIBEIRO et al., 2006; VOLKMER-RIBEIRO; BATISTA, 2007). No caso dessas lesões foi constatada a penetração no globo ocular das diminutas espículas que revestem as gêmulas dessas duas espécies (VOLKMER-RIBEIRO et al., 2006). Uma rica espongofauna, onde se incluíam as duas espécies, foi confirmada por levantamento posterior no rio, nesse local (VOLKMER-RIBEIRO; BATISTA, 2007). Os componentes responsáveis pelas lesões dermatológicas causadas pelas esponjas dulciaqüícolas, ainda não foram determinados, assim como, a histopatologia dessas lesões.

1.8. JUSTIFICATIVA

Entre os agentes indutores de dermatose, encontramos na literatura dermatoses ocupacionais (DA MATTA, 1932, MACHADO, 1947, THOMAS; SCOTT, 1997, BURKE, 2002) causadas por poríferas. Os estudos levam em conta apenas os casos clínicos referentes à incidente por força de trabalhos realizados por escafandristas, mergulhadores, nadadores, pescadores (THOMAS; SCOTT, 1997), trabalhadores de limpeza urbana responsáveis pela retirada de entulhos, plantas e sedimentos do leito de lagos e lagoas que ficam dentro das cidades (LORENZ-SILVA, 2004) e outros profissionais que manipulam esses animais, tanto em ambiente marinho tais como pesquisadores (geólogos, geógrafos, sistematas, biólogos e biomédicos) que estudam a espongofauna marítima e dulciaqüícola, além do grande número de turistas (AMAZONASTUR, 2005). Mas, apesar do acidente relatado por Matta, em 1932, poucos estudos foram feitos para elucidar quais os componentes responsáveis pelas lesões dermatológicas, desencadeadas pelo contato com as esponjas de água doce, como também, não foram realizadas análises histopatológicas de tais lesões.

Relatos recentes de casos, na Região Amazônica (MAGALHÃES et al., 2006;

VOLKMER-RIBEIRO et al., 2006; VOLKMER-RIBEIRO; BATISTA, 2007), de incidentes envolvendo poríferas, apontam o gênero *Drulia* sp. como uma das principais responsáveis por esses acidentes. Por isso, no presente trabalho foram realizados experimentos, em camundongos, com a esponja *Drulia uruguayensis*, abundante na Região Amazônica, para verificar a capacidade indutora de reação dérmica pelo contato com essa espécie nas formas: íntegra, macerada e com suas espículas isoladas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Estudo comparativo da dermatose causada pelas formas: íntegra, macerada e espículas isoladas, da esponja dulcícola *Drulia uruguayensis*, em camundongos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade indutora de dermatose da esponja de água doce *Drulia uruguayensis* no seu estado íntegro, macerado e de espículas isoladas, isentos de resíduos ambientais.

- Verificar a reação inflamatória e tecidual na dermatose induzida pela esponja de água doce *Drulia uruguayensis* no seu estado íntegro, macerado e de espículas isoladas, isentos de resíduos ambientais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ESPONJAS

3.1.1. **Coleta** – A coleta da esponja *Drulia uruguayensis* foi realizada na Praia de Aramanaí, município de Belterra, Estado do Pará, em janeiro de 2007, no início da estação chuvosa. A área escolhida foi um agrupamento de árvores delimitada pelas coordenadas 2°43'11" Sul / 55°0'12" Oeste e 2°43'12" Sul / 55°0'13" Oeste (figura 01).



Figura 1 – Coleta da esponja *Drulia uruguayensis*. A área de coleta está circundada por um círculo.
FONTE: Programa Google Earth.

3.1.2. **Escolha das esponjas** – Para o estudo foram escolhidos apenas os espécimes de *Drulia uruguayensis*.

3.1.3. Classificação taxonômica – A confirmação taxonômica da espécie foi realizada pela Doutora Cecília Volkmer Ribeiro do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Todos os espécimes, utilizados neste trabalho, foram identificados como pertencentes à espécie *Drulia uruguayensis* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1968.

3.1.4. Preparo das esponjas para realização dos experimentos – Todos os espécimes coletados, foram lavados com água para retirada da maior parte dos resíduos ambientais (areia, flora e fauna associados). Após a limpeza, as esponjas foram pesadas, divididas em partes iguais e preparadas como descrito a seguir:

3.1.4.1. Íntegra – Os espécimes foram embalados em papel alumínio individualmente e guardados no freezer a -20°C , até o momento do uso.

3.1.4.2. Macerada – Os espécimes foram macerados em graal de porcelana com auxílio do pistilo, e após, acondicionados em um Becker de plástico, o qual foi vedado com “parafilm” e guardado em freezer a -20°C , até o momento do uso.

3.1.4.3. Espículas isoladas – Para obtenção das espículas a técnica utilizada foi baseada na de VOLKMER-RIBEIRO (1985), com modificações. Após a limpeza, em água corrente, a secagem dos espécimes foi feita, em estufa, por cinco dias, a 30°C . Após a secagem, um total de 136,1g de esponja foi fragmentado e colocado em um Erlenmeyer de 1L contendo 250mL de Ácido Clorídrico PA. Esse material ficou imerso durante um mês para completa dissolução da matéria orgânica das esponjas. Após esse período, foram acrescentados 1000mL de água quantidade suficiente para (q.s.p.) para diluir o ácido clorídrico. Todo o conteúdo do

Erlenmeyer foi repassado para um frasco de vidro de 2L com água q.s.p. a fim de diluir mais o ácido.

Posteriormente ao processo de decantação do material dissolvido no ácido, todo sobrenadante foi centrifugado para recuperação de qualquer conteúdo ainda em suspensão. Após esse processo, todo material dissolvido foi distribuído em 11 tubos do tipo “Falcon” de 50mL para início do processo de limpeza.

Ao material depositado nos tubos Falcon, foram acrescentados éter etílico e água, em uma proporção de 3:1, até completar o volume de 50mL e homogeneizados em agitador de tubos tipo vórtex (Marca Quimis, Modelo Q-220). Durante a decantação, as espículas se depositaram no fundo do tubo e o material contaminante ficou retido na interface água-éter, sendo retirado com auxílio de pipeta Pasteur de plástico. O material mais pesado, depositado em cima das espículas, também foi retirado, com auxílio da pipeta Pasteur, para que não ocorresse a remoção das espículas contidas no “pelet”.

O restante do resíduo foi retirado por meio de ciclos sucessivos de adição de éter etílico à água previamente colocada para cobrir os “pelets”. Esta etapa foi realizada em capela com exaustor. Depois desse processo, quando já não havia material na interface, foi utilizada apenas água destilada para retirada dos resíduos e limpeza final das espículas.

Para retirada das partículas menores de material contaminante, depositado na superfície do “pelet”, foi feito o uso de uma ponteira de 500 μ L encaixada na ponta de uma pipeta Pasteur de plástico. Após isso, foi feita a homogeneização pelo vórtex, decantação e posterior retirada da água sobrenadante por aspiração com pipeta acrílica de 10mL.

No final dessa etapa, foi detectada, visualmente, areia misturada às espículas. A separação foi feita pela diferença de densidade entre os grãos de areia e as espículas. Após a agitação da mistura no vórtex, as espículas foram retiradas, ainda em suspensão, enquanto os grãos de areia decantavam.

As espículas isoladas foram distribuídas nos tubos tipo “Falcon” de 15mL. Cada tubo recebeu espículas, no máximo, até a marca de 3mL do tubo. A partir daí, foi feita a lavagem das espículas para retirada do éter e de qualquer resquício do ácido clorídrico existente. Para isso foi repetida 25 vezes a seqüência que se segue:

- 1) Adição de 12mL de água destilada q. s. p.;
- 2) Homogeneização em Vórtex à velocidade máxima até suspensão completa do pelet;
- 3) Centrifugação a 3.500rpm por 20 minutos;
- 4) Retirada do sobrenadante com pipeta de acrílico de 10mL.

Com as espículas lavadas, o conteúdo dos tubos foi passado para uma bandeja forrada com papel alumínio, que foi colocada na estufa para secagem, em duas passagens, de 3 horas, a 80°C. A bandeja foi deixada para resfriar a temperatura ambiente (figura 6). As espículas foram pesadas em balança analítica da marca Bioprecisa, modelo FA2104N. Alíquotas de 10mg de espículas foram embaladas e autoclavadas a 120°C e 1 ATM.

3.1.5. Análise química das espículas purificadas – As espículas isoladas foram analisadas pela técnica de fluorescência de raios –X por dispersão de energia (ED-XRF), no Laboratório de Análises de Combustíveis (LAPEC), do Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas sob a orientação da Prof^a. Doutora Cláudia Cândida Silva. Para a determinação da composição química das espículas os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram submetidas ao modelo Shimadzu EDX700, usando radiação Rh K α , colimador em 10mm, em atmosfera de vácuo, varredura entre zero a 40KeV e tempo de exposição de 100 segundos.

3.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.2.1. **Animais** – Camundongos não-isogênicos, fêmeas, adultas, com peso entre 18 e 22g ($20g \pm 2g$), provenientes do Biotério Central do Instituto de Pesquisa da Amazônia – INPA foram utilizados nos experimentos. Os animais ficaram acondicionados em gaiolas de plástico, sob temperatura controlada, recebendo água e ração à vontade, no Laboratório de Rotina, do Laboratório de Patologia, da Escola Superior de Saúde, da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.

3.2.2. **Preparo dos animais para realização dos experimentos** – Todos os camundongos dos grupos-experimentais e dos grupos-controle foram tricotomizados parcialmente na região ântero-dorsal, com tesoura limpa, no momento da aplicação (Figura 2A).

3.2.3. **Obtenção da cinética da dermatose** – Para obtenção da cinética de formação da dermatose, foram utilizados oito grupos de camundongos (um grupo para cada hora, para obtenção da curva de cinética), com três animais em cada grupo, que receberam a aplicação tópica de 10mg de esponja macerada, escolhida aleatoriamente entre as três formas de preparo. Para a aplicação, as esponjas foram presas em esparadrapo hipoalérgico microporoso da marca Cremer. Como controles foram utilizados quatro camundongos, nos quais foi aplicado apenas o esparadrapo hipoalérgico microporoso, da marca Cremer. Os esparadrapos e os esparadrapos com as esponjas foram colados, nos dorsos tricotomizados dos animais, por um minuto. Após a aplicação, os animais foram anestesiados e sacrificados com éter etílico nos tempos 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24 e 48 horas. Os animais controle-esparadrapo foram sacrificados nos tempos 1, 6, 9 e 48 horas (um animal / hora). Dois camundongos foram sacrificados 48 horas após a tricotomia, para serem utilizados como controle-normal. Os fragmentos de pele retirados foram colocados, individualmente, em cassetes e fixados com formol a 10%.

3.2.4. Teste da reação tegumentar para as formas preparadas com esponjas íntegras e espículas isoladas – Conforme os resultados obtidos no teste de cinética (item 3.2.3), os animais foram separados em quatro grupos-testes, levando em consideração os horários de pico da atividade: 2, 4 e 12 horas após a aplicação. Os grupos formados foram: Grupo I - Controle normal - com seis camundongos, nos quais foi realizada apenas a tricotomia; Grupo II – Controle do esparadrapo - com seis camundongos, nos quais foram aplicados, na região tricotomizada, o esparadrapo hipoalérgico microporoso, da marca Cremer; Grupo III – das espículas isoladas – contendo doze camundongos, que receberam a aplicação de 10mg de espículas isoladas presas ao esparadrapo; Grupo IV - da esponja íntegra – composto por doze camundongos, que receberam a aplicação de 10mg de esponja íntegra, presa ao esparadrapo.

Para as aplicações foram seguidos os mesmos procedimentos constantes no item 3.2.2. As espículas e a esponja íntegra foram presas no esparadrapo e colocadas em contato com a pele tricotomizada dos animais (figura 2B) e mantidas por pressão manual durante um minuto, após isso o esparadrapo foi retirado e o animal devolvido para a gaiola. Dois camundongos de cada grupo-controle e quatro de cada grupo-experimental foram sacrificados com éter etílico, nos os horários previstos (2, 4 e 12 horas), considerando a hora de aplicação para cada animal. Os fragmentos de pele retirados corresponderam à área de aplicação (figura 2C), sendo colocados, individualmente, em cassetes e fixados com formol a 10%.



Figura 2 – Preparo dos animais experimentais. A) Tricotomia parcial da região dorso-anterior dos camundongos; B) Aplicação de esponja íntegra na região tricotomizada e C) Local da retirada de parte da pele do animal anestesiado, que recebeu a aplicação do material. Tanto nos camundongos controle quanto nos testes, foi realizado o mesmo procedimento.

3.3. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E DIAGNÓSTICO SOBRE OS TEGUMENTOS.

As amostras foram processadas, histologicamente, no Laboratório de Histopatologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, pela técnica em Histopatologia, Maria de Fátima Barbosa.

A avaliação do comprometimento tecidual foi feita sob orientação da Professora Mestre Luciana Botinelli Mendonça Fujimoto, Médica Histopatologista, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Amazonas.

3.3.1. Organização dos fragmentos de pele para preparo dos blocos de parafina.

3.3.1.1. Do experimento de cinética (esponja macerada) – Os fragmentos de pele foram distribuídos em novos cassetes para inclusão e preparo dos blocos de parafina. Em cada cassete foram reunidos todos os fragmentos do mesmo grupo dentro do mesmo horário, conforme esquema abaixo:

GRUPOS	TEMPO (HORAS)	N ° DE ANIMAIS	Nº DE CASSETES	Nº DE BLOCOS
Grupo Normal	48	02	01	01
Controle Esparadrapo	1	01	01	01
	6	01	01	01
	9	01	01	01
	48	01	01	01
Cinética	1	03	01	01
	2	03	01	01
	4	03	01	01
	6	03	01	01
	9	03	01	01
	12	03	01	01
	48	03	01	01

3.3.1.2. Do experimento utilizando esponjas íntegras e espículas isoladas – Os fragmentos de pele foram distribuídos em novos cassetes para inclusão e preparo dos blocos de parafina. Em cada cassette foram reunidos todos os fragmentos do mesmo grupo dentro do mesmo horário, conforme o seguinte esquema:

GRUPOS	TEMPO (HORAS)	N ° DE ANIMAIS	Nº DE CASSETES	Nº DE BLOCOS
Grupo I - normais	2	02	01	01
	4	02	01	01
	12	02	01	01
Grupo II - esparadrapo	2	02	01	01
	4	02	01	01
	12	02	01	01
Grupo III – das espículas	2	04	01	01
	4	04	01	01
	12	04	01	01
Grupo IV – das esponjas íntegras	2	04	01	01
	4	04	01	01
	12	04	01	01

Os fragmentos de pele foram preparados em processador de tecidos (histotécnico) da marca Lupe, como descrito a seguir: os cassetes passaram por 12 etapas com duração de uma hora cada. Na primeira etapa, os cassetes foram mergulhados em álcool 96%; da segunda à sétima, os fragmentos foram imersos em álcool absoluto PA; três banhos de xilol constituíram a oitava, nova e décima etapa, e, por fim, dois banhos de parafina, a 62°C, prepararam os fragmentos de pele para inclusão em parafina líquida. Após a inclusão, em formas de metal, os blocos foram mantidos, por 24 horas, em temperatura ambiente, para o resfriamento e endurecimento da parafina.

3.3.1.3. Preparo das lâminas histológicas – Passado esse período os blocos foram cortados em micrótomo Universal Lupe, modelo MRP 03. De cada bloco foram confeccionadas cinco lâminas e, destas, três foram hidratadas, como a seguir,: Xilol I \Rightarrow Xilol II \Rightarrow Álcool Absoluto \Rightarrow Álcool Absoluto \Rightarrow Álcool 95% \Rightarrow Álcool 70%, sendo que o tempo de duração para cada etapa foi de um minuto.

As lâminas foram coradas com a técnica da Hematoxilina – Eosina (APÊNDICE 01) (duas lâminas), Azul de Toluidina (APÊNDICE 02) (uma lâmina) e duas lâminas foram mantidas como reservas, parafinadas. As lâminas coradas foram desidratadas para montagem da lamínula como a seguir: Álcool 80% \Rightarrow Álcool Absoluto \Rightarrow Álcool Absoluto \Rightarrow Álcool Absoluto \Rightarrow secagem em estufa \Rightarrow Xilol \Rightarrow montagem com a resina sintética Entellan Novo, da marca Merck. O tempo utilizado, em cada passo, foi de um minuto.

3.3.2. **Contagem das células** – As células escolhidas para servirem de parâmetro à verificação da capacidade indutora de dermatose pelas formas de preparo das esponjas foram: mastócitos totais (íntegros e degranulados) e mastócitos degranulados em lâminas coradas com Azul de Toluidina; neutrófilos, linfócitos intra-epiteliais e eosinófilos, em lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Em ambos os experimentos, a contagem das células foi realizada no Microscópio Óptico da marca Olympus CX40. A contagem foi feita as cegas, sendo, para cada animal, contados dez campos com objetiva de 40x. A média e o desvio padrão das contagens celulares de cada grupo foram calculados para a montagem do gráfico de cinética.

As fotomicrografias foram feitas com máquina fotográfica da marca Olympus, modelo FE-210, utilizando microscópio da marca Nikon, modelo YS100.

3.3.3. **Análise estatística** – Para determinar qual forma de preparo das esponjas teria maior capacidade indutora, foi feita a comparação entre os três preparos utilizando a Análise de Variância Fatorial (ANOVA Fatorial). Estas análises foram feitas através do software estatístico Statistica, versão 7.0, com nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESPONJAS

Para o estudo foram escolhidos apenas os espécimes de *Drulia uruguayensis* morfológicamente iguais àqueles provenientes do Museu Natural da Fundação Zoobotânica de Porto Alegre (RS) (figura 3), os quais serviram de referência para a coleta. Alguns espécimes foram excluídos, pois estavam unidos a outras espécies diferentes de esponja. A confirmação taxonômica da espécie foi realizada pela Doutora Cecília Volkmer Ribeiro do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Após a análise taxonômica das espículas isoladas, foi constatada a presença apenas da espécie *Drulia uruguayensis*.

4.2. RENDIMENTO DAS ESPÍCULAS ISOLADAS.

Do material coletado, após lavagem para a retirada de contaminantes, restaram 136,1 g de esponja, que foram utilizados para obtenção das espículas isoladas. Após o processo, o rendimento final das espículas isoladas foi de 83,98 g, o que correspondeu a 61,7% do peso total da esponja *in natura*.



Figura 3 – As esponjas coletadas na Praia do Aramaiaí, município de Belterra, Pará (A), foram separadas (B) pela comparação com os exemplares provenientes do Museu Natural da Fundação Zoobotânica de Porto Alegre (RS) (C)

As figuras 4 e 5 mostram o aspecto do material durante o processo de purificação das espículas e a figura 6 mostra o aspecto final do processo.

4.3. ANÁLISE QUÍMICA DAS ESPÍCULAS PURIFICADAS

A análise química das espículas purificadas constatou a presença dos seguintes componentes (concentrações em porcentagem): Sílica, 18,862%; Cálcio, 0,098%; Ferro, 0,002%; Cobre, 0,011%; Zinco, 0,002%, estando de acordo com o Uriz (2006), segundo a qual, as espículas, nas esponjas siliciosas, são formadas de sílica com traços de outros elementos, como enxofre, alumínio, potássio, cálcio e sódio. Não foi possível determinar os outros compostos presentes na espícula pela sensibilidade limitada da técnica utilizada.

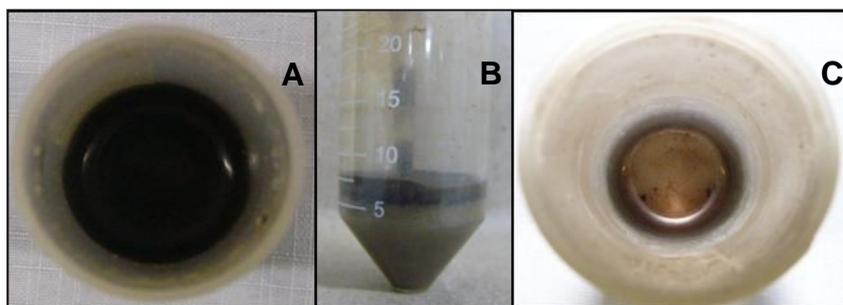


Figura 4 – Retirada do resíduo dissolvido pelo ácido clorídrico PA: A) Aspecto do material antes da remoção dos resíduos; B) Retirada do material dissolvido com pipeta Pasteur de plástico - observar o “pelet” de espículas no fundo do tubo e C) Aspecto do material após a remoção dos resíduos

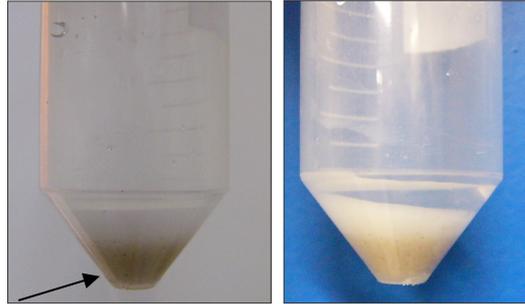


Figura 5 – Separação de grãos de areia ainda presentes no “pelet” de espículas



Figura 6 – Aspecto final das espículas isoladas antes (A) da secagem em estufa (B). C) Espículas prontas para serem acondicionadas em béquer de plástico e guardadas em freezer

4.4. CINÉTICA DA DERMATOSE (ESPONJA MACERADA)

No Quadro 2 estão apresentados as médias e desvios padrões usados para montagem dos gráficos de cinética, tanto do teste, utilizando a esponja macerada, quanto do controle-esparadrapo, assim como as médias e desvios padrões do controle normal.

Na cinética da dermatose, nos animais que receberam a esponja macerada (Gráfico 1), foram observadas as seguintes variações celulares.

Na primeira hora foram observados um pico de mastócitos totais (34,30), juntamente, com a rápida ascendência no número de mastócitos degranulados (5,40) e forte queda no número de eosinófilos (2,27). Os neutrófilos tiveram leve queda (0,23) na quantidade e o número de linfócitos intra-epiteliais não sofreu alteração (0,30).

Na 2ª hora, a quantidade de mastócitos totais decaiu (27,07), enquanto a de mastócitos degranulados alcançou o seu pico (8,43). Neste horário, houve aumento dos números de eosinófilos (3,00) e neutrófilos (0,27). O número de linfócitos intra-epiteliais diminuiu (0,27).

Horário	Linfócitos IE	Neutrófilos	Eosinófilos	Mastócitos	Degranulados
CONTROLE NORMAL					
48	0,30±0,47	0,25±0,44	4,15±2,35	25,95±6,47	2,50±3,86
CONTROLE-ESPARADRAPO					
1	0,70±0,95	0,40±0,70	4,40±2,99	30,70±6,43	4,10±3,63
6	0,70±0,82	0,10±0,32	3,30±2,11	22,50±5,66	8,10±3,45
9	0,50±0,85	0,30±0,48	3,60±2,37	30,20±5,94	3,10±2,51
48	0,50±0,53	0,10±0,32	3,30±1,57	20,70±4,11	3,20±4,69
EXPERIMENTO TESTE (ESPONJA MACERADA)					
1	0,30±0,47	0,23±0,43	2,27±1,66	34,30±13,68	5,40±8,13
2	0,27±0,52	0,27±0,58	3,00±1,84	27,07±8,55	8,43±8,72
4	0,57±0,68	0,63±0,76	4,90±3,03	26,20±9,86	1,70±2,05
6	0,30±0,53	0,73±0,74	4,40±2,34	30,53±7,63	2,47±3,80
9	0,33±0,48	0,33±0,55	4,57±1,96	31,30±8,77	3,63±3,08
12	0,27±0,45	0,57±0,77	3,40±2,18	36,20±11,43	3,60±3,54
24	0,27±0,45	0,17±0,38	4,00±2,30	29,17±10,75	3,20±2,85
48	0,43±0,68	0,30±0,53	3,27±2,03	25,17±7,42	2,73±1,57

Quadro 2 – As médias e desvios-padrões obtidos nos grupos e utilizados na montagem dos gráficos de cinética

A partir da 2ª hora, ocorreu declínio do número de mastócitos até a 4ª hora (26,20), então ocorreu uma nova ascendência dos mastócitos, que atingiram um novo pico (36,20), na 12ª hora, após a aplicação. O pico observado na 12ª hora foi maior do que o registrado para a 1ª hora. Nesse ínterim, o número de mastócitos degranulados diminuiu abruptamente, até atingir a sua menor quantidade, observada na 4ª hora (1,70). Logo após, o número de mastócitos degranulados aumentou gradativamente (2,47) até atingir o seu platô (3,60), observado na 12ª hora. A quantidade de ambos, mastócitos totais e degranulados, voltou a diminuir da 12ª à 48ª hora, atingindo valores próximos ao basal (25,17 e 2,73, respectivamente).

Os eosinófilos continuaram em ascensão da 2^a à 4^a hora, momento em que apresentou seu maior valor (4,90). A partir desse horário, houve oscilações da 6^a à 48^a hora, com valores menores em cada queda registrada, sendo a mais perceptível na 12^a hora.

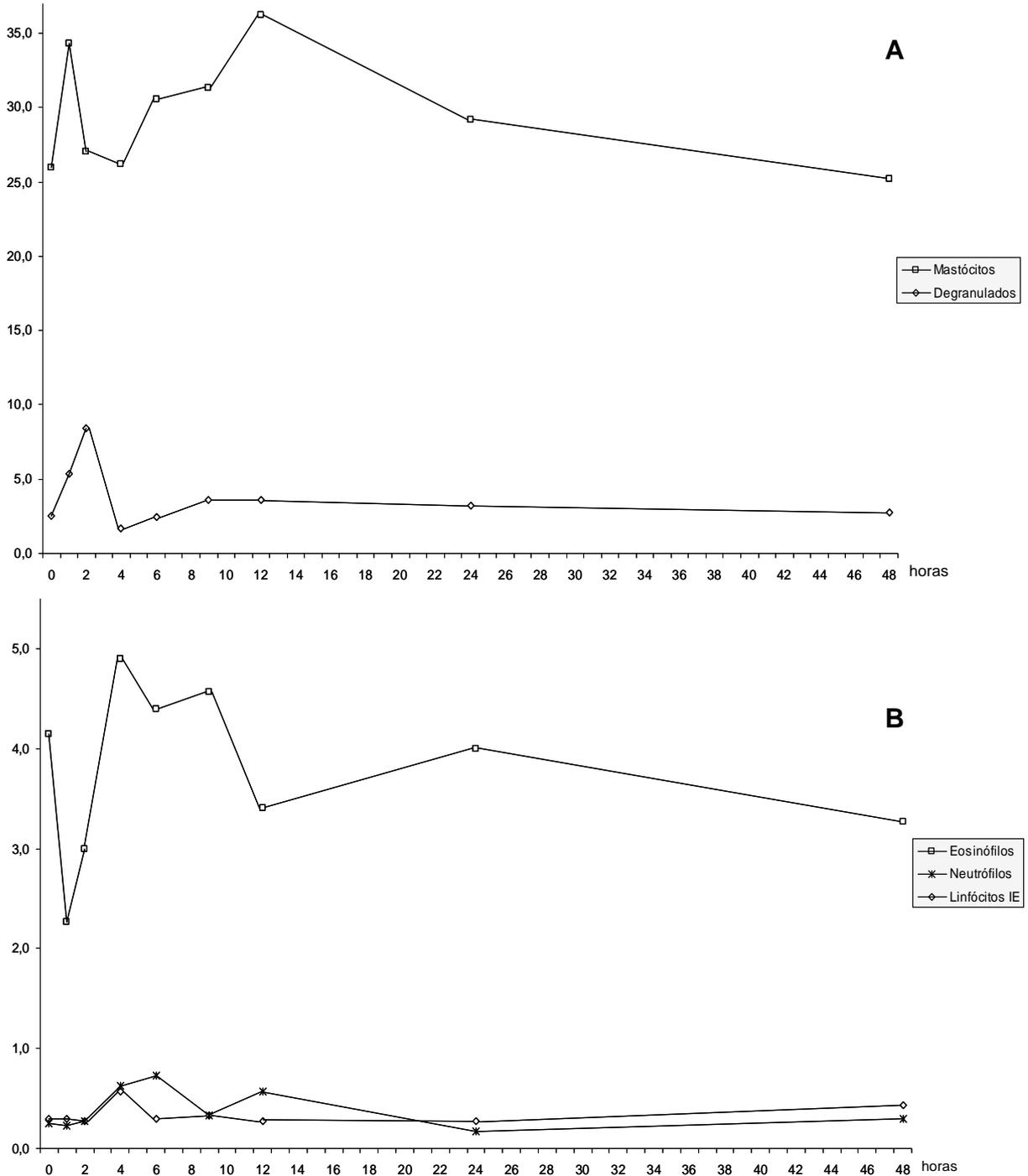


Gráfico 1 – Cinética de mastócitos e mastócitos degranulados (A); e eosinófilos e neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais (B) na dermatose induzida pela esponja de água doce *Drulia uruguayensis* utilizando seu preparo por maceração. O valor zero, no eixo das horas, representa a quantidade da célula no animal normal 48 horas após a tricotomia

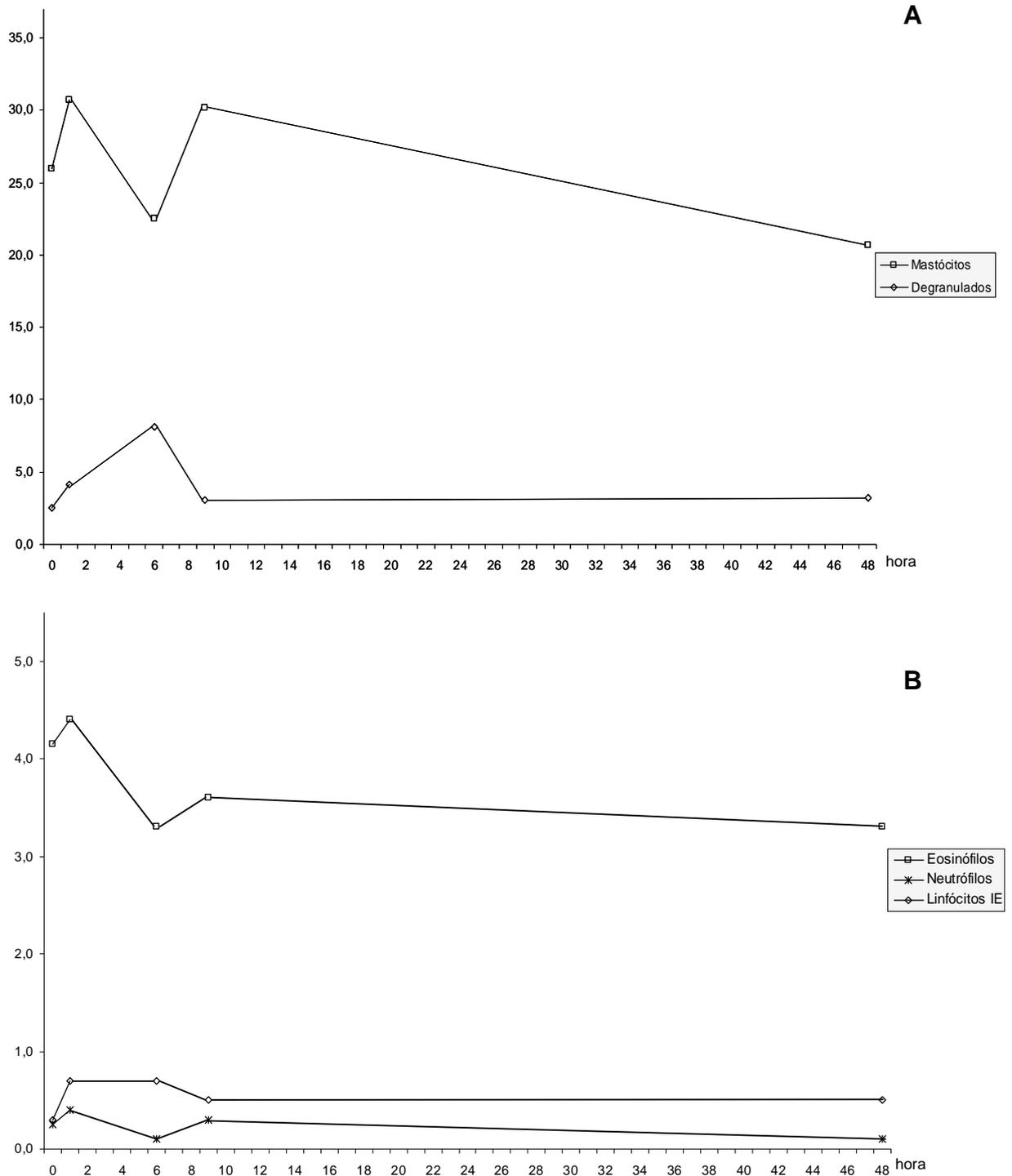


Gráfico 2 – Cinética dos mastócitos e mastócitos degranulados (A) e eosinófilos, neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais (B) utilizando esparadrapo como controle. O valor zero, no eixo das horas, representa a quantidade da célula no animal normal 48 horas após a tricotomia

Os linfócitos intra-epiteliais alcançaram o pico, na 4ª hora, decaindo até a 6ª hora (0,30). Essa quantidade de linfócitos intra-epiteliais, até a 24ª hora, foi mantida com leve

oscilação. Na 48ª hora houve novo pico (0,43), porém, menor do que o observado anteriormente, na 4ª hora.

O número de neutrófilos aumentou a partir da 2ª hora e atingiu o pico, na 6ª hora (0,73). A quantidade de neutrófilos diminuiu na 9ª (0,33) e, na 12ª hora, outro pico de neutrófilos foi observado (0,57), mas esse pico foi menor que o primeiro, o da 6ª hora. Na 24ª hora houve diminuição mais acentuada do número de neutrófilos (1,7), do que a obtida na 9ª hora, e na 48ª hora, um discreto aumento (0,30), foi observado.

No controle-esparadrapo, houve aumento na quantidade de mastócitos na 1ª hora (30,70) com queda acentuada na 6ª hora (2,50) e nova elevação na 9ª hora (30,20), sendo esse novo pico similar ao da 1ª hora. Após isso, a quantidade de mastócitos caiu continuamente até a 48ª hora (20,70), ficando abaixo do valor basal (25,95). Os mastócitos degranulados tiveram contínua elevação até a 6ª hora (8,10), sendo seu pico máximo nesse horário. Após, na 9ª hora, sofreu diminuição (3,10) que se manteve constante até a 48ª hora (3,2), estando este valor acima do basal (2,50).

Os eosinófilos tiveram leve aumento na 1ª hora, seguida de uma forte queda na 6ª hora (3,30). Na 9ª hora a quantidade de eosinófilos aumentou discretamente (3,6), tendo ligeira queda na 48ª hora (3,30).

A quantidade de linfócitos intra-epiteliais aumentou na 1ª hora (0,70), mantendo esse valor até 6ª hora. Após discreta queda (0,50), o novo valor se manteve até a 48ª hora, ficando acima do valor basal (0,30) neste horário.

Os neutrófilos tiveram discreta elevação (0,40) na 1ª hora, com queda na 6ª (0,10) e nova ascendência na 9ª hora (0,30), a partir da qual decresceu até a 48ª hora (0,10), ficando com o mesmo valor da 6ª hora.

Ao comparar o experimento teste com o controle-esparadrapo, foi observado que os mastócitos totais, após a 1ª hora, decaíram, tanto no teste quanto no controle. No entanto, a

partir da 4ª hora, enquanto no controle houve queda contínua até a 6ª hora, o teste mostrou elevação do número de mastócitos totais até esse horário. Em seguida, os mastócitos totais, tanto no teste quanto no controle-esparadrapo, tiveram elevação em suas quantidades até a 12ª hora, para, em seguida, ambos decaíram até a 48ª hora. Nessa hora, o valor do experimento teste ficou abaixo do basal, assim como o controle-esparadrapo, sendo este mais baixo que o teste.

No tempo decorrido até a 9ª hora, os mastócitos degranulados, tanto do teste quanto do controle-esparadrapo atingiram picos com valores semelhantes, sendo o do teste maior. No entanto, o pico gerado pelo teste foi alcançado na 2ª hora, enquanto o do controle apenas na 6ª hora após a aplicação. Após cada pico, a quantidade de mastócitos degranulados decaiu, sendo a queda no valor do teste mais acentuada que no controle. A partir da 9ª hora, ambos os experimentos atingiram valores similares e permaneceram estáveis até a 48ª hora.

Na 1ª hora após a aplicação, a quantidade de eosinófilos do teste caiu fortemente, enquanto a do controle teve leve elevação. Após alcançar seu pico máximo, o número de eosinófilos no teste teve pequena diminuição, enquanto no controle a queda foi mais acentuada. Depois da 9ª hora, em ambos os experimentos, as quantidades de eosinófilos tenderam a permanecer com valores estáveis e semelhantes até a 48ª hora, tendo, nesse horário, quantidades abaixo do basal.

Após a aplicação, o número de neutrófilos no teste caiu levemente na 1ª hora, enquanto que a quantidade no controle subiu acentuadamente. A partir desse momento, o número de neutrófilos do teste teve forte ascendência até a 6ª hora, sendo este seu pico máximo, e o valor no controle decaiu acentuadamente. Na 9ª hora, o número de neutrófilos do controle e do teste mostraram valores muito próximos, sendo que os do teste vinham de uma queda de quantidade e os do controle de uma ascendência. Após outro aumento do número de células na 12ª hora, os neutrófilos do teste decaíram, ficando, na 48ª hora, com valor próximo

ao basal, ao contrário do que ocorreu com os valores do controle que caíram até a quantidade alcançada na 6ª hora, bastante abaixo do basal.

A quantidade de linfócitos intra-epiteliais do controle-esparadrapo foi maior do que no teste ao longo de todo o período de 48 horas. O pico máximo alcançado pelo controle logo na primeira hora foi mantido até a 6ª hora, ao contrário do ocorrido no teste em que o pico foi alcançado na 4ª hora, seguido de forte queda na 6ª hora. No experimento teste, após a 9ª hora, o número de linfócitos intra-epiteliais teve leve oscilação até a 24ª hora, seguida de uma elevação que fez com que seu valor se aproximasse do apresentado pelo controle na 48ª hora, sendo esse valor, para o controle, igual ao da 9ª hora.

4.5. COMPARAÇÃO DA INDUÇÃO DE DERMATOSE PELAS TRÊS FORMAS DE PREPARO DE ESPONJAS (MACERADA, ÍNTEGRAS E ESPÍCULAS ISOLADAS).

A contagem das células, utilizadas como parâmetro de comparação da indução de dermatose entre as três formas de preparo das esponjas, foi realizada nos horários de pico da degranulação dos mastócitos (2h), da quantidade de eosinófilos (4h) e o segundo pico de mastócitos totais (12h), oriundos da determinação da cinética da dermatose usando a esponja na forma macerada. Os horários foram escolhidos por abranger as principais variações celulares surgidas na cinética.

Para montagem dos gráficos comparativos (Figura 9A e B) foram utilizadas as médias e os desvios padrões apresentados no Quadro 3. Os valores usados da esponja macerada foram aqueles obtidos no experimento para determinação da cinética da dermatose. A Tabela 1 mostra os resultados estatísticos da comparação entre as formas de preparo das esponjas.

No perfil cinético encontrado nos experimentos usando esponjas íntegras e espículas isoladas, comparando com os controles normal e esparadrapo, foram observadas as seguintes

	Hora	Linfócitos IE	Eosinófilos	Neutrófilos	Mastócitos	Degranulados
Normal	2	0,35±0,49	2,50±1,88	0,40±0,75	25,40±5,94	5,80±5,37
	4	0,35±0,49	1,95±2,04	0,70±1,08	25,75±8,87	6,65±3,82
	12	0,40±0,60	5,30±2,41	1,15±1,46	26,70±8,23	9,60±4,59
Esparadrupo	2	0,40±0,50	2,20±1,61	0,85±1,04	30,05±13,34	11,00±6,03
	4	0,30±0,57	2,30±2,34	0,80±1,06	25,20±4,81	5,25±5,27
	12	0,10±0,31	4,75±3,29	0,75±0,85	30,65±8,23	5,10±3,67
Esponja Íntegra	2	0,50±0,69	2,65±2,14	0,60±0,89	34,95±13,34	13,10±10,34
	4	0,50±0,77	2,65±2,14	2,20±3,80	30,30±7,59	11,10±9,99
	12	0,40±0,76	4,10±1,84	0,50±0,82	29,50±12,24	6,60±7,92
Espículas Isoladas	2	0,35±0,49	1,70±2,11	0,35±0,82	30,40±7,56	6,05±4,51
	4	0,35±0,68	3,40±2,07	0,45±0,83	28,05±15,11	4,80±4,45
	12	0,10±0,31	2,40±2,19	0,35±0,49	23,40±6,32	6,55±5,92
Esponja Macerada	2	0,27±0,52	3,00±1,84	0,27±0,58	27,07±8,55	8,43±8,72
	4	0,57±0,68	4,90±3,03	0,63±0,76	26,20±9,86	1,70±2,05
	12	0,27±0,45	3,40±2,18	0,57±0,77	36,20±11,43	3,60±3,54

Quadro 3 – As médias e desvios-padrões utilizados na montagem dos gráficos do experimento com as formas de preparo das esponjas íntegra, espículas isoladas e esponjas maceradas

variações celulares ao longo dos três horários analisados. O perfil cinético da aplicação da esponja macerada foi mostrado no item 4.4.

Os animais em que foi aplicada a esponja íntegra apresentaram queda no número de mastócitos da 2^a para a 4^a hora, e desta para a 12^a hora, porém de forma mais discreta. Esta variação foi diferente da encontrada nos controles, onde, no normal, o número de mastócitos aumentou levemente ao longo das horas e, no controle-esparadrupo, houve queda acentuada de mastócitos na 4^a hora. Os mastócitos degranulados tiveram queda contínua da 2^a à 12^a hora, seguindo sentido inverso ao observado no controle normal (figura 9A), e levemente similar ao ocorrido no controle-esparadrupo, onde houve estabilização da 4^a para a 12^a hora. A variação entre a quantidade de eosinófilos do teste e o controle-esparadrupo, da 2^a à 4^a hora, foi semelhante, embora os valores do teste tenham sido maiores e, assim como nos controles normal e esparadrupo, os eosinófilos tiveram aumento no seu número na 12^a hora, ficando abaixo dos valores do controle. Apenas na 4^a hora do controle normal, houve queda do número de eosinófilos, diferentemente do ocorrido com o teste usando esponja íntegra e o

			p < 0,05
Aplicação	Normal		0,311505
	Esparadrapo		0,849363
	Macerada		0,102783
	Íntegra		0,000005
	Espículas Isoladas		ns*
Células	Mastócitos		0,000000
	Degranulados		0,013353
	Linfócitos IE		0,000000
	Eosinófilos		0,000000
	Neutrófilos		ns*
Aplicação/Células	Normal	Mastócitos	0,000631
	Normal	Degranulados	0,131484
	Normal	Linfócitos IE	0,578718
	Normal	Eosinófilos	0,531871
	Esparadrapo	Mastócitos	0,445886
	Esparadrapo	Degranulados	0,761292
	Esparadrapo	Linfócitos IE	0,835202
	Esparadrapo	Eosinófilos	0,805933
	Macerada	Mastócitos	0,260593
	Macerada	Degranulados	0,000002
	Macerada	Linfócitos IE	0,432441
	Macerada	Eosinófilos	0,044459
	Íntegra	Mastócitos	0,014842
	Íntegra	Degranulados	0,000310
	Íntegra	Linfócitos IE	0,037652
	Íntegra	Eosinófilos	0,018397

Tabela 1 – Valores de p nas relações entre o tipo de aplicação e as células usadas com parâmetro, assim como entre as formas de aplicação. p < 0,05 (* ns: não significante)

controle-esparadrapo. Linfócitos intra-epiteliais permaneceram constantes da 2^a para a 4^a hora, caindo levemente na 12^a hora, variação diferente do controle normal, que seguiu sentido inverso e similar ao controle-esparadrapo, cujos valores ficaram abaixo do linfócitos intra-epiteliais do teste. Neutrófilos tiveram forte ascendência na 4^a hora usando a esponja íntegra, caindo fortemente na 12^a hora, diferente do controle-esparadrapo, em que a quantidade de neutrófilos permaneceu constante, e do controle normal, que teve aumento contínuo no número de neutrófilos até a 12^a hora.

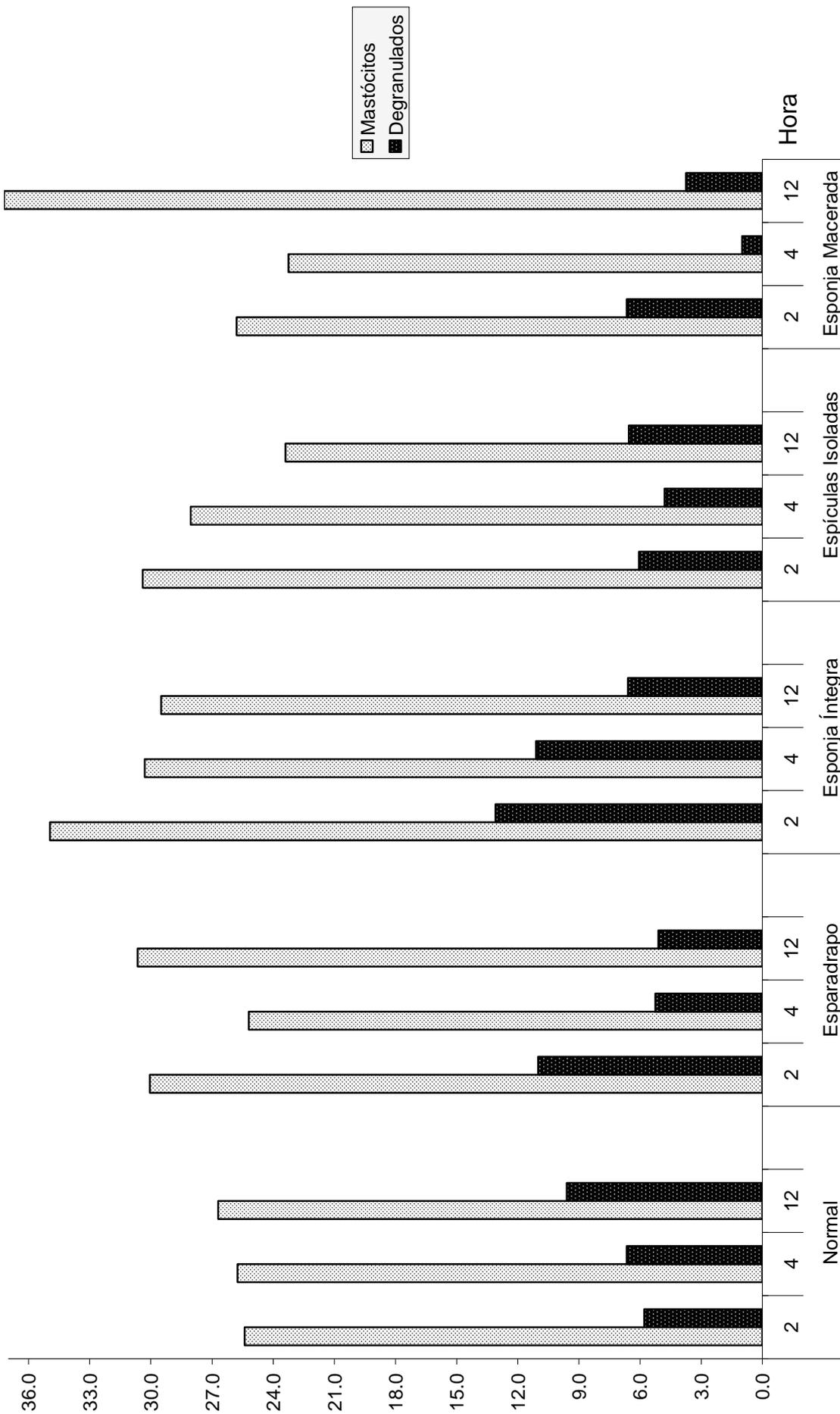


Figura 3 – Gráfico comparativo demonstrando a quantidade máxima de células por material utilizado e horários de pico. O gráfico acima mostra o comportamento de mastócitos e mastócitos degranulados

Após a aplicação das espículas isoladas, o número de mastócitos decaiu até a 12^a hora, contrariamente ao controle normal, em que a quantidade aumentou discretamente até esse horário e com grande diferença para o controle-esparadrapo, que teve queda na 4^a hora, mas manteve valores similares na 2^a e 12^a hora. Os mastócitos degranulados tiveram queda na 4^a hora e nova elevação na 12^a, sendo esse perfil diferente dos controles normal e esparadrapo, que aumentaram e diminuíram de quantidade, respectivamente. Os eosinófilos aumentaram de quantidade na 4^a hora, ficando abaixo dos maiores valores alcançados nos controles, além do fato de que, nos controles, essa elevação se deu na 12^a hora. A quantidade de neutrófilos apresentou valores semelhantes ao longos dos três horários no experimento teste, ao contrário do controle normal que foi ascendendo continuamente, mas similar ao ocorrido com o controle-esparadrapo, apesar de que neste, a quantidade de neutrófilos foi maior que no teste. Os linfócitos intra-epiteliais tiveram queda na 12^a hora, tendo um perfil cinético semelhante ao do controle-esparadrapo e diferente do controle normal que manteve valores estáveis nos três horários.

Ao comparar as formas de aplicação com a reação inflamatória (dada pela contagem dos mastócitos totais, mastócitos degranulados, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais), foi constatado, que: A) a esponja íntegra teve maior significância em causar reação tegumentar ($p = 0,000005$) (figura 10) e B) os mastócitos foram as células com a variação mais acentuada ($p = 0,0018$).

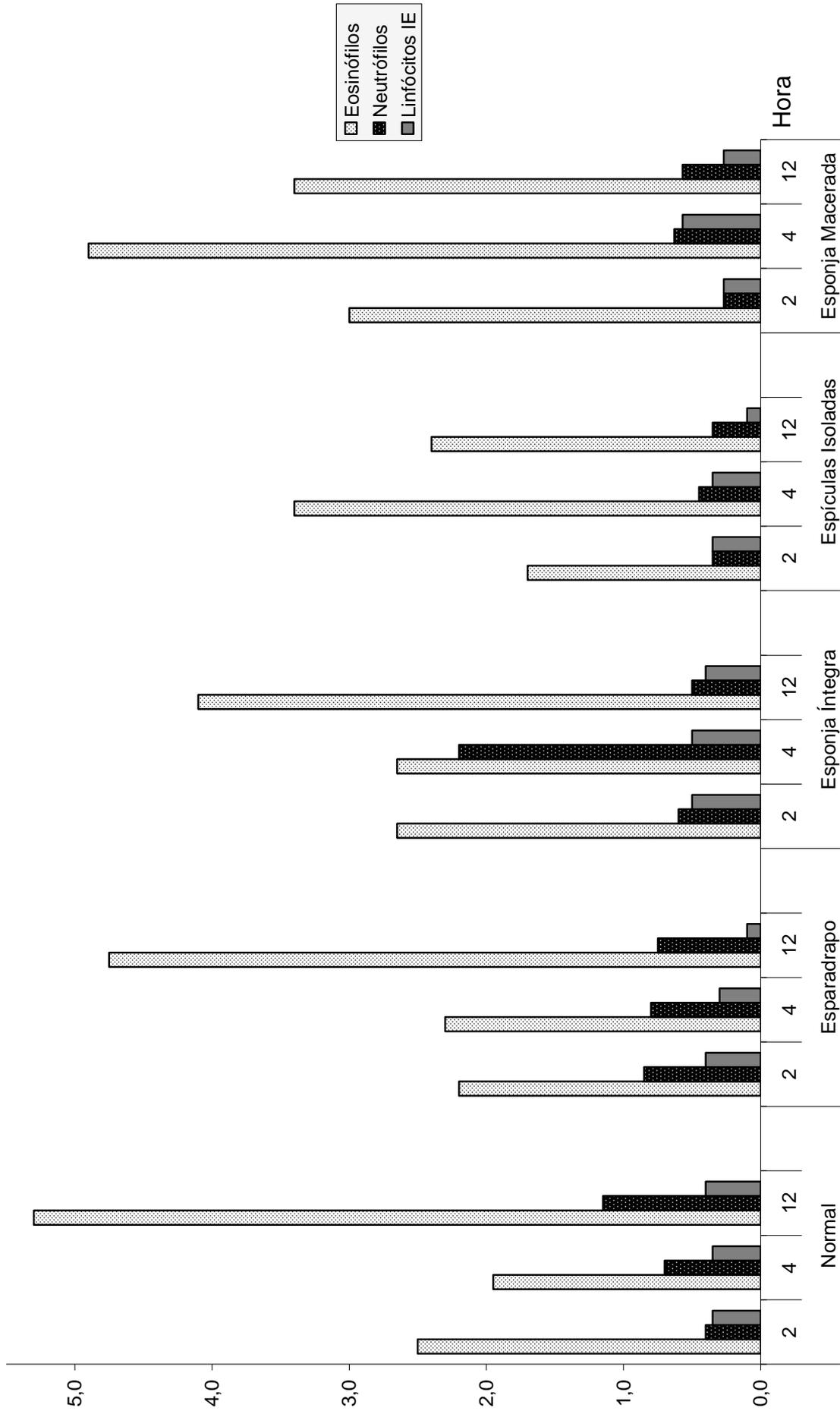


Figura 4 – Gráfico comparativo demonstrando a quantidade máxima de células por material utilizado e horários de pico. O gráfico acima mostra o comportamento de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos intra-epiteliais

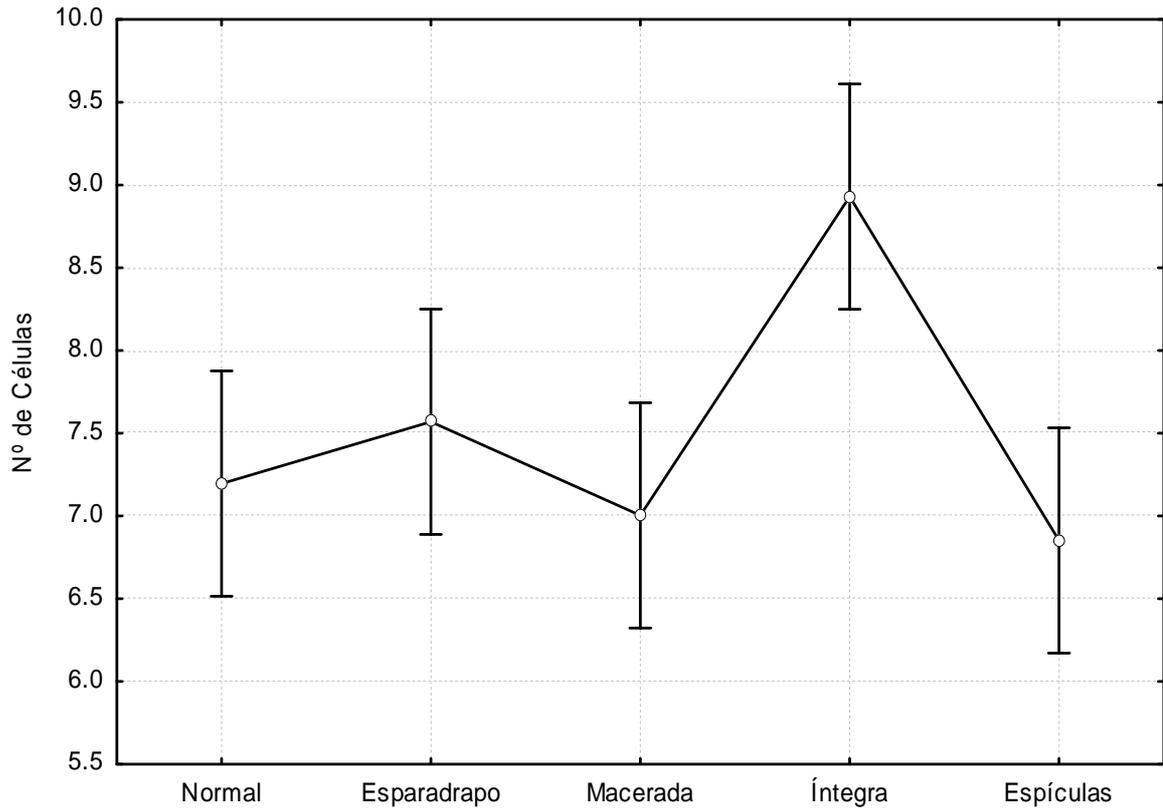


Figura 5 – Gráfico mostrando a relação entre a esponja na forma íntegra e a variação do número de células, com $p < 0,05$

FONTE: Software Statistica, versão 7,0.

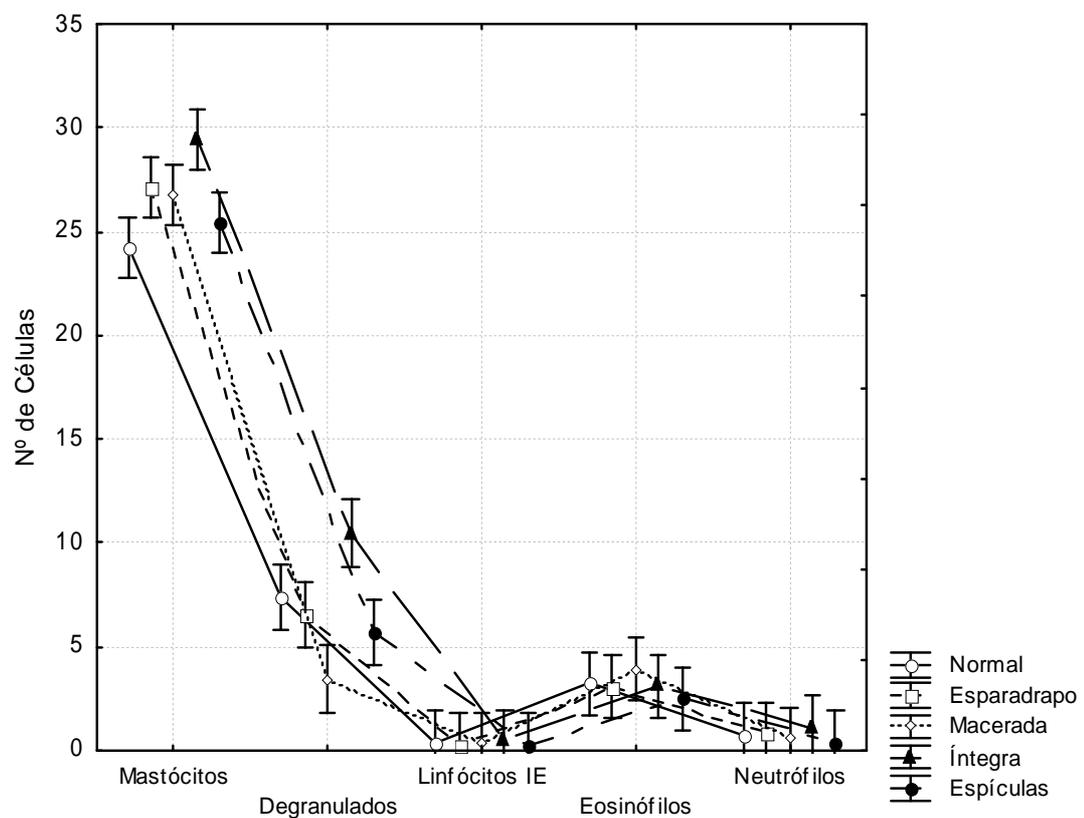


Figura 6 – Gráfico mostrando a relação entre o tipo de aplicação e a linhagem celular, com $p < 0,05$

FONTE: Software Statistica, versão 7,0.

4.6. ASPECTO HISTOPATOLÓGICO CAUSADO PELAS FORMAS DE PREPARO DE ESPONJAS (MACERADA, ÍNTEGRAS E ESPÍCULAS ISOLADAS).

4.6.1 Controle normal

4.6.1.1. Duas horas – Cortes microscópicos de dois fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme mostrando apêndices distribuídos de forma habitual e sem apresentar particularidades. Hipoderme constituída por tecido adiposo (Apêndice 03 A).

4.6.1.2. Quatro horas – Cortes microscópicos de dois fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme mostrando apêndices distribuídos de forma habitual e sem apresentar particularidades, feixes de fibras colágenas arrançadas frouxamente, discreto infiltrado inflamatório difuso, constituído por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, histiócitos e mastócitos, com ou sem degranulação. Hipoderme constituída por tecido adiposo maduro e sem particularidades, entremeado com capilares levemente dilatados e congestos (Apêndice 03 B).

4.6.1.3. Doze horas – Cortes microscópicos de dois fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme mostrando apêndices distribuídos de forma habitual e sem apresentar particularidades, aumento do infiltrado inflamatório. Hipoderme sem particularidades com delicados capilares congestos (Apêndice 03 C).

4.6.2 Controle esparadrapo

4.6.2.1. Duas horas – Cortes microscópicos de dois fragmentos de tegumento exibem epiderme delgada constituída por duas a três camadas sem particularidades, exceto em área periférica de um dos dois fragmentos no qual foi observada pequena área levemente espessada da epiderme. Adjacente, derme exibindo infiltrado inflamatório evidente e difuso representado por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos, com poucos degranulados. No restante do fragmento, a derme apresenta infiltrado discreto e difuso. Apêndices e hipoderme sem particularidades (Apêndice 04 A).

4.6.2.2. Quatro horas – Cortes microscópicos de dois fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada constituída por duas a três camadas sem particularidades. A derme exibe infiltrado difuso por toda extensão da derme, à exceção e área na borda, que apresenta leve concentração de células inflamatórias, representadas principalmente por mastócitos, com raros degranulados, eosinófilos, linfócitos e raros neutrófilos, em meio a fibra colágenas espessadas e hialinizadas. Hipoderme constituída por tecido adiposo maduro e sem particularidades, entremeados por capilares levemente dilatados e congestos (Apêndice 04 B)

4.6.2.3. Doze horas – Cortes microscópicos de três fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme com infiltrado inflamatório linfohistiocitário discreto e difuso, o qual está entremeado por escassos neutrófilos, eosinófilos e freqüentes mastócitos. Apêndices cutâneos sem particularidades. Hipoderme constituída por tecido adiposo maduro e por delicados capilares com discreta congestão e vasodilatação (Apêndice 04 C)

4.6.3 Esponja macerada

4.6.3.1. Duas horas – Cortes microscópicos de três fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme delgada com infiltrado inflamatório linfocitário discreto e focal, o qual está entremeado por escassos neutrófilos, eosinófilos e freqüentes mastócitos, com e sem mastócitos degranulados. Apêndices cutâneos sem particularidades. Hipoderme constituída por tecido adiposo maduro e por delicados capilares congestos (Apêndice 05 A).

4.6.3.2. Quatro horas – Cortes microscópicos de três fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada constituída por duas a três camadas sem particularidades, exceto em área central em um, de três fragmentos, no qual se observa adelgaçamento da epiderme, com presença de camada de queratinócitos, com núcleo condensado e hipercromático. Em continuidade a esta área, edema discreto e hialinização de fibras colágenas, entremeado com discreto infiltrado constituído de mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Apêndice 05 B). Nas áreas circundantes e em toda extensão da derme presença de mínimo infiltrado inflamatório com neutrófilos, eosinófilos, histiócitos e linfócitos, ao lado de apêndice sem alteração digna de nota. Hipoderme constituída por tecido adiposo maduro e sem particularidades, entremeados por capilares moderadamente dilatados e congestos.

4.6.3.3. Doze horas – Cortes microscópicos de três fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme organizada com fibras colágenas frouxas, com infiltrado inflamatório linfocitário discreto e difuso, o qual está entremeado por escassos neutrófilos, eosinófilos e freqüentes mastócitos, com e sem mastócitos degranulados. Apêndices cutâneos sem particularidades. Hipoderme constituída

por tecido adiposo maduro e por delicados capilares com discreta congestão e vasodilatação (Apêndice 05 C).

4.6.4 Esponja íntegra

4.6.4.1. Duas horas – Cortes microscópicos de quatro fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme sem formar arranjo específico. Frequentes mastócitos, maioria não degranulada, além de esparsos linfócitos, histiócitos e raros neutrófilos e eosinófilos. Apêndices cutâneos sem particularidades. Hipoderme apresentou capilaridade moderadamente dilatada e congesta em um de quatro fragmentos (Apêndice 06 A).

4.6.4.2. Quatro horas – Cortes microscópicos de quatro fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada constituída por duas a três camadas sem particularidades, exceto em área focal e restrita em um, de quatro fragmentos, no qual se observou que a camada de queratinócitos estava descontínua, em continuidade com derme exibindo maior concentração de células inflamatórias, representadas principalmente por mastócitos, mastócitos degranulados, eosinófilos e neutrófilos, em meio a fibra colágenas espessadas e hialinizadas. No restante da derme e nos outros fragmentos o infiltrado foi difuso e muito discreto. Hipoderme constituída por tecido adiposo maduro e sem particularidades, entremeados por capilares moderadamente dilatados e congestos (Apêndice 06 B).

4.6.4.3. Doze horas – Cortes microscópicos de quatro fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme delgada apresentando discreto infiltrado difuso representada por frequentes mastócitos, raros eosinófilos,

neutrófilos, linfócitos e histiócitos. Apêndices cutâneos sem particularidades. Hipoderme sem alteração (Apêndice 06 C).

4.6.5 Espículas isoladas

4.6.5.1. Duas horas – Cortes microscópicos de quatro fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme mostrando apêndices distribuídos de forma habitual e sem apresentar particularidades, discreto infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, histiócitos e freqüentes mastócitos com raros degranulados. Discreta vasodilatação e congestão em alguns vasos da hipoderme, em um, de quatro fragmentos (Apêndice 07 A).

4.6.5.2. Quatro horas – Cortes microscópicos de quatro fragmentos de tegumento exibem epiderme delgada constituída por duas a três camadas sem particularidades, exceto em área central, em um, de quatro fragmento no qual foi observada pequena área de descontinuidade da epiderme, cuja borda estava constituída por queratinócitos com núcleo condensado e hipercromático exibindo no fundo derme apresentando material amorfo e hialino entremeado por freqüentes neutrófilos e raros eosinófilos e mastócitos degranulados. Adjacente, derme exibindo infiltrado discreto e difuso representado por eosinófilos e mastócitos. Apêndices sem particularidades e vasos da hipoderme discretamente dilatados e congestos (Apêndice 07 B).

4.6.5.3. Doze horas – Cortes microscópicos de quatro fragmentos de tegumento exibiram epiderme delgada sem particularidade com duas a três camadas. Derme mostrando apêndices distribuídos de forma habitual e sem apresentar particularidades, discreto infiltrado

inflamatório constituído por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, histiócitos e freqüentes mastócitos com raros degranulados. Congestão na hipoderme mais evidente (Apêndice 07 C).

5. DISCUSSÃO

Apesar das dermatoses causadas por esponjas já serem conhecidas, seu relato é escasso na literatura nacional e internacional (BRAZIL, 1938; BURKE, 1997; BURNETT, CALTON; MORGAN, 1987; HILBERT, 1955; ISBISTER; HOOPER, 2005; LORENZ-SILVA, 2004; MATTA, 1932; ROSSON; TOLLE, 1989; THOMAS; SCOTT, 1997; VOLKMER-RIBEIRO; BATISTA, 2007; VOLKMER-RIBEIRO et al., 2006). Além disso, não existe consenso, na literatura consultada, se o componente ativador dessa dermatose seria parte integrante da esponja ou um fator externo. No caso específico da Amazônia, os relatos apenas indicam que a manipulação das esponjas causa dermatose, sem, contudo, indicar um possível agente patogênico. Assim sendo, objetivamos neste trabalho definir qual forma de contato com as esponjas (íntegras, maceradas e suas espículas isoladas) pode causar maior reação inflamatória. Para isto, utilizamos a espécie *Drulia uruguayensis* que foi escolhida por ser a mais abundante no local onde foi relatado, pelo autor (MAGALHÃES, 2006), um incidente ocorrido por contato com fragmentos de esponjas.

Nossos resultados mostraram que a aplicação de esponjas íntegras induziu maior reação inflamatória ($p = 0,000005$) que as esponjas maceradas e as espículas isoladas. Da Matta (1932) e Isbister; Hooper (2005) relatam casos em que o contato direto com a esponja íntegra ocasionou forte dermatose. No entanto, em ambos os casos, os incidentes ocorreram

dentro da água (no rio ou no mar), significando que as esponjas estavam, presumivelmente, vivas. Neste estado as poríferas, principalmente marinhas, produzem componentes como alcalóides e purinas que têm comprovada ação biológica, como: atividade antibacteriana, antifúngica, hemolítica, citotóxica, neurotóxica, letal, contrátil e contra células de linhagem cancerígena (BERLINCK et al., 1996; CHEHADE et al., 1997; MURICY et al., 1993; TORRES et al., 2000, 2002). No presente trabalho foram utilizadas esponjas mortas e secas, o que minimizou a possibilidade de algum agente biológico, como os citados anteriormente, ter tido influência em nossos resultados, apesar de não haver, na literatura, estudos químicos sobre as poríferas de água doce da Amazônia. A maior capacidade da forma íntegra de causar reação inflamatória pode ser devido à característica morfológica da espécie *D. uruguayensis*. Sua estrutura arborescente, com feixes de espículas (megascleras) agregadas, forma ramificações externas pontiagudas (VOLKMER-RIBEIRO; TAVARES, 1995), permitindo à esponja íntegra, causar uma lesão mais pontual e profunda da epiderme que as outras formas de preparo, fato corroborado pela observação de que pequenos pedaços de esponjas íntegras ficavam presos na epiderme dos animais por pouco tempo após a aplicação, ao mesmo tempo em que impediu a esponja como um todo de tocar a pele. Essas características sugerem que os mastócitos podem ter sido ativados pela perfuração da epiderme, alcançando o tecido conjuntivo, agindo diretamente sobre os mesmos, por ação mecânica (GALLI; TSAI, 2008; METZ; MAURER, 2007), além de levar consigo algum componente bioquímico da esponja, preso entre os feixes de espículas, de natureza ainda não conhecida, como, também, material da flora normal da pele dos animais experimentais que, somada à agressão física, induziram reação mastocitária com significativa degranulação ($p = 0,000310$).

Lorenz-Silva (2004) relatou incidente ocorrido na cidade de Três Lagoas, Minas Gerais, Brasil, onde trabalhadores de limpeza urbana, foram acometidos de forte prurido e inchaço nas pernas após contato com um depósito de espongilito/diatomito sedimentado no

fundo de uma das lagoas, sendo a reação dérmica atribuída às espículas presentes no depósito. O envolvimento de espículas isoladas nas lesões acima citadas é concordante com os relatos de lesões provenientes da confecção de cerâmica por indígenas amazônidas (HILBERT, 1955; MACHADO, 1947) e lesões oculares, em crianças, causadas pelas gemoscleras isoladas na região de Araguatins, Estado do Tocantins, Brasil (VOLKMER-RIBEIRO et al., 2006). Além disso, a sílica é relatada na literatura como associada a diversas patologias, como silicoses, inflamação aguda nos pulmões, desordens auto-imunes e câncer (HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2008), além de interferir na capacidade de células dendríticas derivadas da linhagem mielóide em responder ao lipopolissacarídeo (LPS), ao oligonucleotídeo citocina-fosfato-guanina (CpG) e ao ácido poliinosínico:policitídílico (Poli I:C) (BEAMER, 2008). O contato com os cristais de sílica (SiOH) pode, pelas hipóteses existentes, causar lesão tecidual pela apoptose de macrófagos que falharam em fagocitar suas partículas, pela liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β , MIP-1, MIP-2, MCP-1 e CXCL-8 ou pela produção de radicais livres como peroxinitrito (ONOOO $_2^{\bullet}$) (HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2008; PERNIS, 2005).

Por esses motivos, foi feita a aplicação de espículas isoladas para verificar se haveria participação destas no processo inflamatório causado pelas esponjas íntegras. No intuito de obter espículas separadas e isoladas do corpo da esponja e dos contaminantes ambientais, foram tentadas as técnicas descritas por Volkmer-Ribeiro (1985) – ácido nítrico a 65% - e Schönberg (1999) – solução de água régia 70% e de ácido nítrico a 70%. Ambas foram inadequadas para este trabalho por que os autores utilizaram essas técnicas para fins taxonômicos, onde resquícios ambientais não interferem na identificação específica das esponjas. Para o nosso trabalho, eram necessárias espículas soltas e isoladas (livres de qualquer contaminação ambiental). Para isso, utilizamos ácido clorídrico PA, por ser altamente corrosivo para componentes orgânicos e alguns inorgânicos. O resultado, após

remoção do ácido e da matéria dissolvida, em espículas sem alteração morfológica e livre de resíduos ambientais. Entretanto, pelo fato da forma de separação ter sido a decantação, as espículas das gêmulas, ou gemosclera, por serem menores e mais leves que as outras espículas, as megascleras, foram perdidas durante o processo de isolamento.

Ao testar a capacidade indutora das espículas isoladas, nossos resultados mostraram que, estatisticamente, não houve envolvimento dessas espículas na reação inflamatória, sugerindo que estas apenas facilitam a entrada de outros agentes agressores. Essa idéia está de acordo com as proposições de Burke, 2002, Rosson; Tolle (1989) e Thomas; Scott (1997), os quais sugerem que o ferimento por espículas permite a entrada de toxinas da esponja na pele, culminando na reação inflamatória observada. Embora os relatos de Hilbert, 1955; Lorenz-Silva, 2004; Machado, 1947 e Volkmer-Ribeiro et al., 2006, atribuam às espículas a reação inflamatória observada, nos respectivos estudos, os locais em que ocorreram as lesões (dentro da água ou manipulando argila com espículas) permitem deduzir que, provavelmente, as espículas mais facilitaram a entrada de outro material, sendo este o real agente inflamatório, ao lesionarem os locais de contato, do que provocaram, elas mesmas, um reação inflamatória.

Mas, ao observar as lesões histopatológicas na aplicação com espículas, a lesão surgida na quarta hora foi a mais agressiva, com descontinuação da epiderme maior que na esponja íntegra, o que contradiz os dados estatísticos. No entanto, as lesões, em todas as aplicações, à exceção do normal, ocorreram em um único animal de cada grupo. Uma possibilidade para o aparecimento destas lesões talvez seja uma maior suscetibilidade de alguns animais, para responderem mais acentuadamente as escarificações e, durante a separação dos animais em grupos para os experimentos, esses animais terem sido colocados juntos no grupo da 4ª hora. Porém, pelo padrão das lesões, nas aplicações da esponja íntegra e macerada, essa possibilidade parece não ser a mais correta. Diversas características da espícula, na aplicação das mesmas, auxiliam o entendimento de uma lesão mais extensa,

porém sem ativar mais fortemente as células. Pelo fato das espículas serem muito leves, a quantidade necessária para atingir os 10 mg utilizados no experimento, foi maior do que a usada na aplicação das esponjas macerada e íntegra. Além disso, as megascleras têm as duas pontas afiladas (VOLKMER-RIBEIRO; TAVARES, 1995), podendo provocar, durante o atrito de um minuto, a perda da camada epidérmica do animal. Entretanto, tendo a lesão surgida em apenas um animal deste grupo, esta se torna mais sugestiva da manipulação durante a aplicação do que pelo contato com as espículas ou suscetibilidade dos animais. Corroborando esse raciocínio, observamos, na aplicação da esponja macerada, que o atrito provocou o adelgaçamento do epitélio, sugerindo que a existência de pedaços pequenos, mas suficientemente rígidos podem causar essa injúria, ou o contato direto com todos os componentes da esponja, incluindo aí algum agente químico ou bioquímico não conhecido, possa ter atuado como abrasivo para causar a lesão, mas não suficiente para romper a epiderme. Isso explicaria a pouca capacidade lesiva, por parte das esponjas maceradas e espículas isoladas, que pareceu ser imediata e de rápida recuperação, pois não é visto processos cicatriciais nos cortes histológicos de doze horas e pelo fato das esponjas terem provocado reação inflamatória na primeira hora. Apesar do tipo de lesão ser mais pontual e profundo, a reação inflamatória pelas esponjas íntegras também foi imediata e com recuperação rápida, concordando com o padrão da lesão que mostra uma restrita área afetada pela penetração da ponta mais externa dos feixes de megascleras.

6. CONCLUSÕES

1. A forma íntegra causou maior reação inflamatória, seguida da forma macerada.
2. As espículas isoladas (megascleras), purificadas e autoclavadas, não causam reação dérmica, mas podem provocar injúrias mecânicas que facilitam a entrada de outros agentes indutores de reação inflamatória.
3. As esponjas maceradas possuem baixa capacidade de induzir reação inflamatória, provavelmente por não possuírem os feixes de espículas que permitem penetrar na epiderme e invadir o tecido conjuntivo.
4. Por não ter sido estudado os outros componentes da esponja, tais como: gemoscleras, compostos químicos, microbiológicos, dentre outros, que representam 38,3% do peso total da esponja, estes deverão ser investigados em trabalhos futuros para verificar as suas participações na lesão causada pela esponja íntegra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, T. C. A. **Esponjas (Porifera, Demospongiae) indicadoras ambientais na APA Meandros do Rio Araguaia, Brasil**. 2007. 177 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos
- BEAMER, C. A.; HOLIAN, A. Silica suppresses Toll-like receptor ligand-induced dendritic cell activation. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 2053-2063, jun. 2008.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. de; NETO, A. G. de F.; RODRIGUES, C. J. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2ed. Barueri, SP: Manole, 2003.
- BELARBI, E. H.; GÓMEZ, A. C.; CHISTI, Y.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnol. Adv.** v. 21, p. 585-598, 2003.
- BERLINCK, R. G. S.; OGAWA C. A.; ALMEIDA, A. M. P.; SANCHEZ, M. A. A.; MALPEZZI, E. L. A.; COSTA, L. V.; HAJDU, E.; FREITAS, J. C. Chemical and Pharmacological Characterization of Halitoxin from *Amphimedon viridis* (Prorifera) from the Southeastern Brazilian Coast. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 115C, n. 2, p. 155-163, 1996.
- BRAZIL, T.P.S. **Cauicy**. Separata do Relatório apresentado ao Ministério das Relações Exteriores em 1936 pelo chefe da Comissão Demarcadora de Limites do Serviço do Sector do Oeste. Rio de Janeiro: Leuzinger S. A. 1938. p. 11-29.
- BURKE, W. A. Cutaneous reactions to marine sponges and bryozoans. **Dermatologic Therapy**, v. 15, p. 26-29, 2002.
- BURNETT, J. W.; CALTON, G. J.; MORGAN, R. J. Dermatitis due to stinging sponges. **Cutis**, v. 39, p. 476, 1987.
- CHEHADE, C. C.; DIAS, R. L. A.; BERLINCK, R. G. S.C; FERREIRA, A. G.; COSTA, L. V.; RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; FREITAS, J. C.; HAJDU, E. 1,3-Dimethylisoguanine, a new purine from the marine sponge *Amphimedon viridis*. **J. Nat. Prod.** v. 60, p. 729-731, 1997.

COPETTI, N. **Métodos de colorações histológicas e citológicas**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 171 p.

AMAZONASTUR – EMPRESA ESTADUAL DE TURISMO. **Síntese dos Indicadores de Turismo do Amazonas 2000/2005**. Manaus: AMAZONASTUR, 2005. 41 slides, colorido

FERREIRA, E. G.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PORTELA, T. A.; SILVEIRA, E. R.; HAJDU, E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porífera) collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará State, Brazil. IN: CUSTÓDIO, M. R.; LÔBO-HAJDU, G.; HAJDU, E.; MURICY, G. (editors). **Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability**. 7th ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p. 313-318. (Série Livros 28).

GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cell: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 49, p. 7-19, 2008.

GOMES, D. M. C. **Cerâmica Arqueológica da Amazônia: Vasilhas da Coleção Tapajônica MAE-USP**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Fapesp: Imprensa Oficial do Estado, 2002. (Acervo 3).

HAMILTON, R. F. Jr; THAKUR, S. A.; HOLIAN, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 1242-1258, 2008.

HILBERT, P. P. A Cerâmica Arqueológica de Oriximiná. **Instituto de Antropologia e Etnologia do Pará**. Belém: Museu Goeldi, v. 9, p. 33-37, 1955.

ISBISTER, G. K.; HOOPER, J. N. A. Clinical effects of stings by sponges of the genus *Tedania* and a review of sponge stings worldwide. **Toxicon**, v. 46, p. 782-785, 2005.

KUKENTHAL, R. Parte II: Sub-reino: Metazoa: Porifera. In: _____. **Guia de Trabalhos Práticos de Zoologia**. 19. ed. Coimbra: Editora Atlântica, 1986.

LORENZ-SILVA, J. L. **O Espongilito de Três Lagoas, MS: registro e caracterização com ênfase em micropaleontologia**. São Leopoldo, RS: Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, 2004.

MACHADO, O. X. de B. **Zoologia: espongiários (Porifera)**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, publicação nº 102, anexo 05. 1947.

MAGALHÃES A. O.; VOLKMER-RIBEIRO C.; BARCELLOS J. F. M.; CARDOSO J. L. C.; DOS-SANTOS M. C. Report on two cases of human skin injuries caused by sponge spicules at Amazon. In: INTERNATIONAL SPONGE SYMPOSIUM, 7th, 2006. Búzios. **Book of Abstracts**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p. 150.

MANCONI, R.; PRONZATO, R. Global diversity of sponges (Porífera: Spongillina) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 27-33, 2008.

- MATTA, A. D. Cai e Cauxí. **Revista do Instituto Geográfico e Histórico do Amazonas**, v. 4, n. 4, p. 129-132, 1934.
- MATTA, A. D. Epidermatite erythematoso devida a espongiário de água doce. **Brasil - Médico**, v. 19, p. 435-436, 1932.
- MEIXNER, M. J.; LÜTER, C.; ECKERT, C.; ITSKOVICH, V.; JANUSSEN, D.; von REINTELEN, T.; BOHNE, A. V.; MEIXNER, J. M.; HESS, W. R. Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p.875-886, 2007.
- MELÃO, M da G.; ROCHA, O. Biomass and productivity of the freshwater sponge *Metania spinata* (Carter, 1881) (Demospongiae: Metaniidae) in a Brazilian reservoir. **Hydrobiologia**, v. 390, p. 1-10, 1999.
- METZ, M.; GRIMBALDESTON, M. A.; NAKAE, S.; PILIPONSKY, M.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. **Immunological Reviews**, v. 217, p. 304-328, 2007.
- METZ, M.; MAURER, M. Mast cells – key effector cells in immune responses. **TRENDS in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 234-241, 2007.
- MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, A. B. da R.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 281, p. 1-12, 2002.
- MÜLLER, W. E. G.; BELIKOV, S. I.; TREMEL, W.; PERRY, C. C.; GIESKES, W. W. C.; BOREIKO, A.; SCHRÖDER, H. C. Siliceous spicules in marine demosponges (example *Suberites domuncula*). **Micron**, v. 37, p. 107-120, 2006.
- MÜLLER, W. E.; ROTHENBERGER, M.; BOREIKO, A. TREMEL, W.; REIBER, A. SCHRÖDER H. C. Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. **Cell Tissue Res.**, v. 321, p. 285-297, 2005
- MURICY, G. ; HAJDU, E. ; ARAUJO, F. V. ; HAGLER, A. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). **Sci. Mar.**, v. 57, n. 4, p. 427-432, 1993.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.
- PERNIS, B. Silica and the immune system. **Acta Biomed.**, suppl. 2, p. 38-44, 2005.

RANGEL, M. SANCTIS, B.; FREITAS, J. C.; POLATTO, J. M.; GRANATO, A. C.; BERLINCK, R. G. S.; HADJU, E. et al. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 262, p. 31-40, 2001.

REDMOND, N. E.; van SOEST, R. W. M.; KELLY, M.; RALEIGH, J.; TRAVERS, S. A. A.; McCORMACK, G. P. Reassessment of the classification of the Order Heplosclerida (Class Demospongiae, Phylum Porifera) using 18rRNA gene sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 344-352, 2007.

ROSSON, C. L.; TOLLE, S. W. Management of marine stings and scrapes. **West. J. Med.**, v. 150, p. 97-100, jan. 1989.

SCHÖNBERG, C. H. L. An improved method of tissue digestion for spicule mounts in sponge taxonomy. **Mem. QLD. Mus.** v. 44, p. 524-533, 1999

STORER, T. I. USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Filo Porifera: esponjas. In: _____. **Zoologia Geral**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editorial Nacional, 2002. p. 323-332.

THOMAS, C.; SCOTT, S. Bites, Cuts and Stings.. In: THOMAS, C. **All stings considered: first aid and medical treatment of Hawai'i's marine injuries**. Honolulu: University of Hawai'i Press, 1997. p. 86-89.

TORRES, Y. R.; BERLINCK, R. G. S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; RERREIRA, A. G.; HADJU, E.; MURICY, G. Arenosclerins A–C and haliclonacyclamine E, new tetracyclic alkaloids from a brazilian endemic Haplosclerid sponge *Arenosclera brasiliensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p 1098-1105, 2000.

TORRES, Y. R.; BERLINCK, R. G. S.; NASCIMENTO, G. G. F.; FORTIER, S. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasilienses*. **Toxicon**, v. 40, p. 885-891, 2002.

TURK, T.; FRANGEZ, R.; SEPCIC, K. Mechanisms of Toxicity of 3-Alkylpyridinium polymers from marine sponge *Reniera sarai*. **Marine Drugs**, v. 5, p. 157-167, 2007.

URIZ, M. J. Mineral skeletogenesis in sponges. **Can. J. Zool.**, v. 84, p. 322-356, 2006.

VOLKMER-RIBEIRO, C. Esponjas de Água Doce. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOLOGIA. **Manual de Técnicas para Preparação de coleções zoológicas**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoologia, 1985. p. 1-6.

VOLKMER-RIBEIRO, C. Esponjas. In: JOLLY, C. A.; BICUDO, C. E. de M., **Biodiversidade do Estado de São Paulo, síntese do conhecimento ao final do século XX**, 4: Invertebrados de água doce. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 1-9

VOLKMER-RIBEIRO, C. Porifera. In: HURLBERT, S. H. ; RODRIGUES, G. ; SANTOS, N. D. (Eds.). **Aquatic Biota of Tropical South America**, Part 2 : Anarthropoda. San Diego State University, San Diego, Cal.: 86-95. 1981

VOLKMER-RIBEIRO, C.; BATISTA, T. C. A. Levantamento de cauxi (Porífera, Demospongiae), provável agente etiológico de doença ocular em humanos, Araguatins, rio Araguaia, Estado do Tocantins, Brasil. **Rev. Bras. de Zool.**, v. 24, n. 1, p. 133-143, mar 2007.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; LENZI, H. L.; ORÉFICE, F.; PELAJO-MACHADO, M.; ALENCAR, L. M. de; FONSECA, C. F.; BATISTA, T. C. A.; MANZO, P. P. A.; COELHO, J.; MACHADO, M. Freshwater sponge spicules: a new agent of ocular pathology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 899-903, Dec 2006.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; PAULS, S. M. Freshwater sponges (Porifera, Demospongiae) from Venezuela. **Acta Biol. Venez.**, v.. 20, n. 1, p. 1-28, mar 2000.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; ROSA-BARBOSA, R. Neotropical freshwater sponges of the family Potamolepidae Brien, 1967. In: LEVI, C.; BOURY-ESNAULT (Eds.). **Biologie de Spongiaires**. Colloques Internationaux du C.N.R.S. v. 291, p. 503-511, 1979.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; TAVARES, M. da C. M. Redescrção de *Drulia uruguayensis* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1968 com redefinição do gênero *Drulia* GRAY, 1867 (Porifera: Metaniidae). **Biociências**, v. 3, n. 1, p. 183-205, jun 1995.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; TAVARES, M. da C. M. Sponges from the flooded sandy beaches of two amazonian clear water rivers (Porifera). **Iheringia**, v. 75, p. 187-188, set 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE 01 – PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA-EOSINA (BEHMER et al, 2003)

- 1) Desparafinar, hidratar;
- 2) Lavar em água de torneira por 5 minutos;
- 3) Corar pela Hematoxilina de Harris por 5 a 15 minutos;
- 4) Lavar em água de torneira por 5 minutos e limpar as lâminas;
- 5) Diferenciar em álcool-ácido até que os núcleos fiquem bem diferenciados;
- 6) Lavar em água de torneira por 10 minutos;
- 7) Corar pela eosina por 3 a 5 minutos;
- 8) Lavar em água destilada;
- 9) Desidratar;
- 10) Montar.

Resultados: Azul – núcleo, bactérias e cálcio;

Resultados: Rosa – citoplasma;

Resultados: Vermelho – hemácias e granulações eosinofílicas

Resultados: Azul-claro – mucoproteínas

APÊNDICE 02 – PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO PELO AZUL DE TOLUIDINA
(COPETTI, 2004).

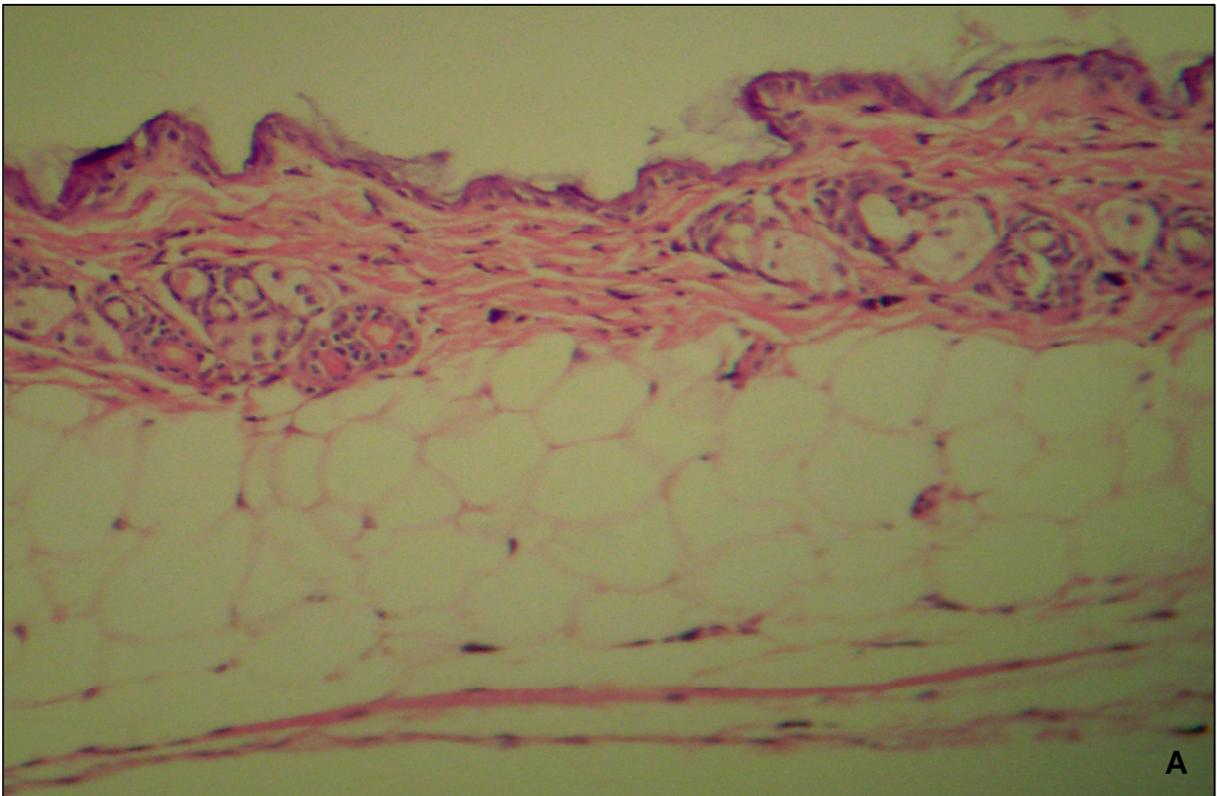
- 1) Desparafinar, hidratar;
- 2) Lavar em água de torneira por 5 minutos;
- 3) Corar pela Solução de Toluidina por 1 minutos;
- 4) Lavar rapidamente em água destilada;
- 5) Álcool etílico absoluto em três passadas;
- 6) Xilol: 3 passadas;
- 7) Montar.

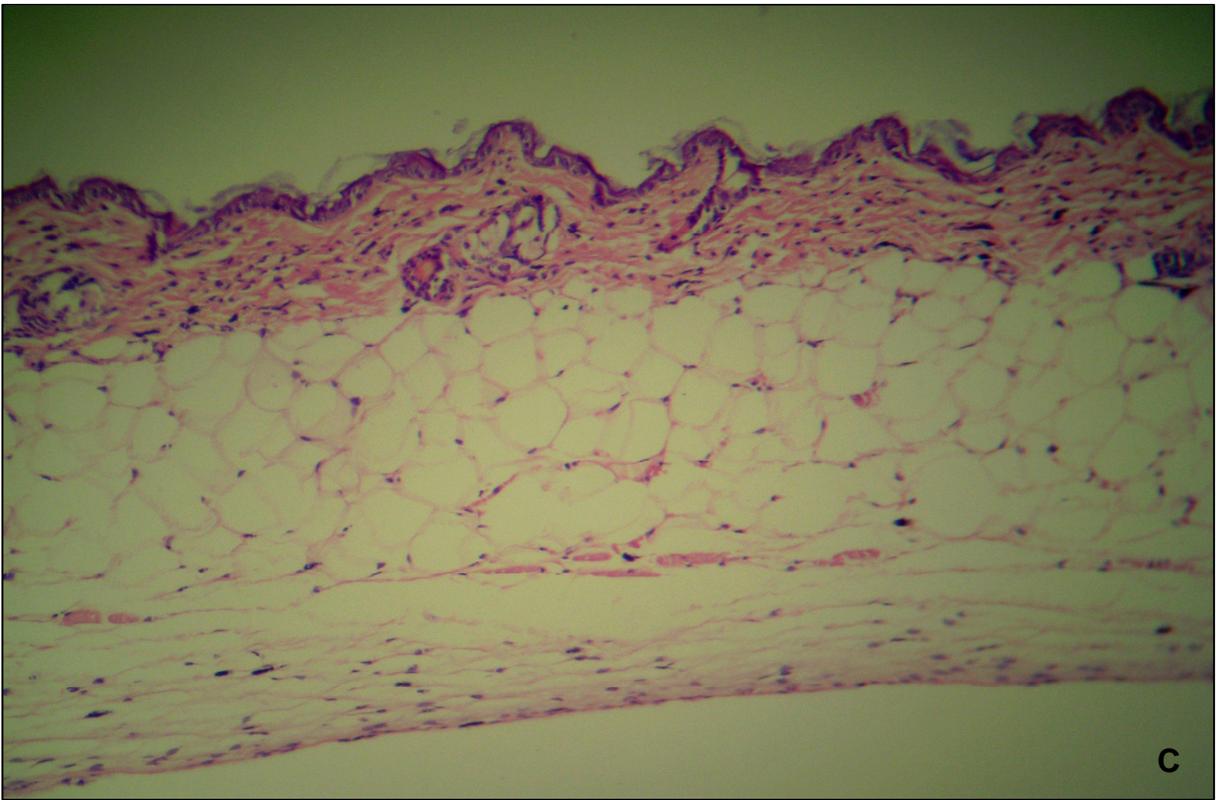
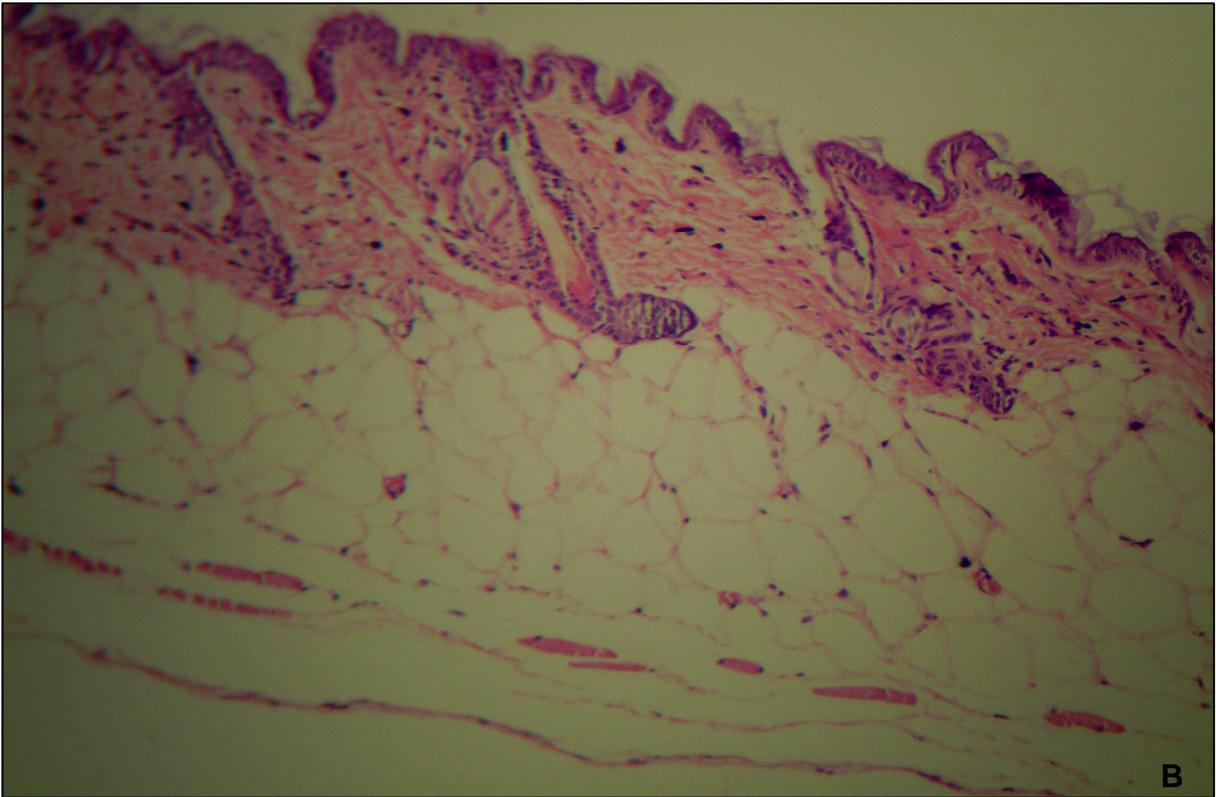
Resultados: Azul – núcleo;

Resultados: Vermelho – mucopolissacarídeos ácidos e granulações dos mastócitos;

APÊNDICE 03 – ASPECTO HISTOLÓGICO DO TEGUMENTO DE CAMUNDONGO TRICOTOMIZADO. AUMENTO 10X

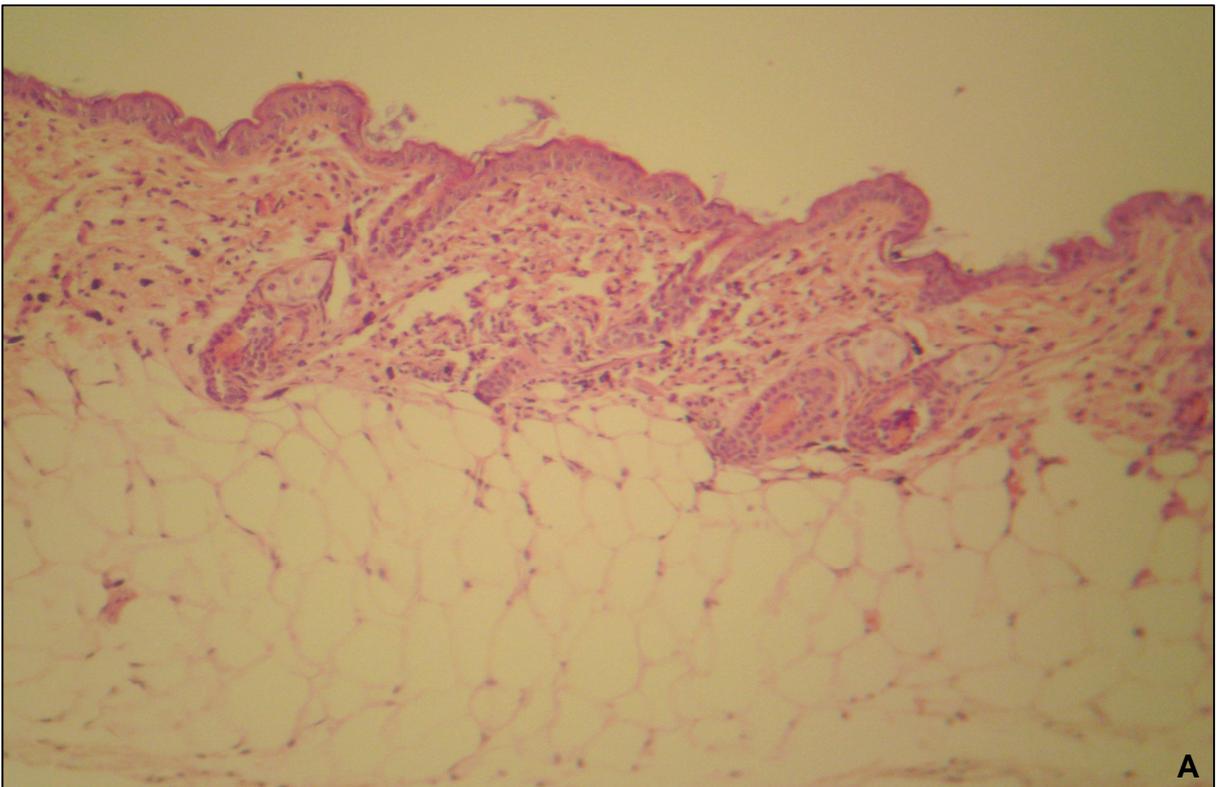
- a) Aspecto após duas horas da tricotomia;
- b) Aspecto após quatro horas da tricotomia e
- c) Aspecto após doze horas da tricotomia.

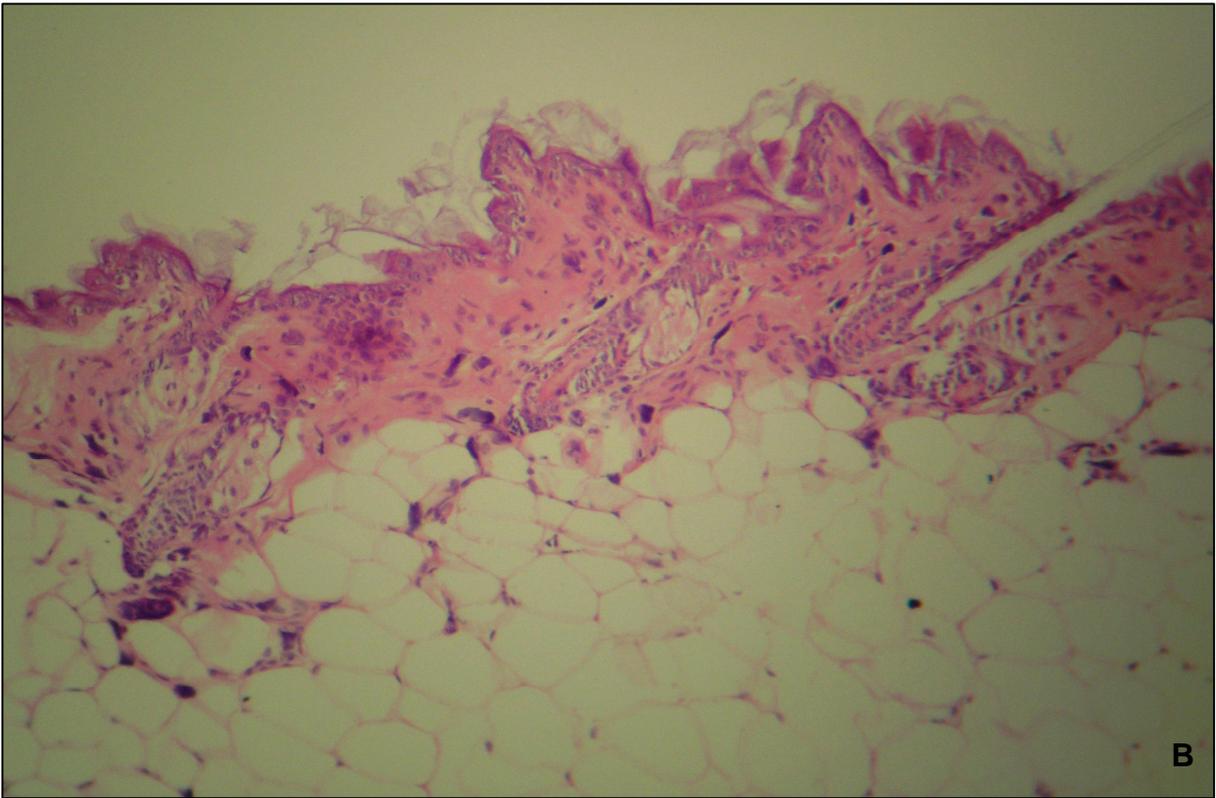




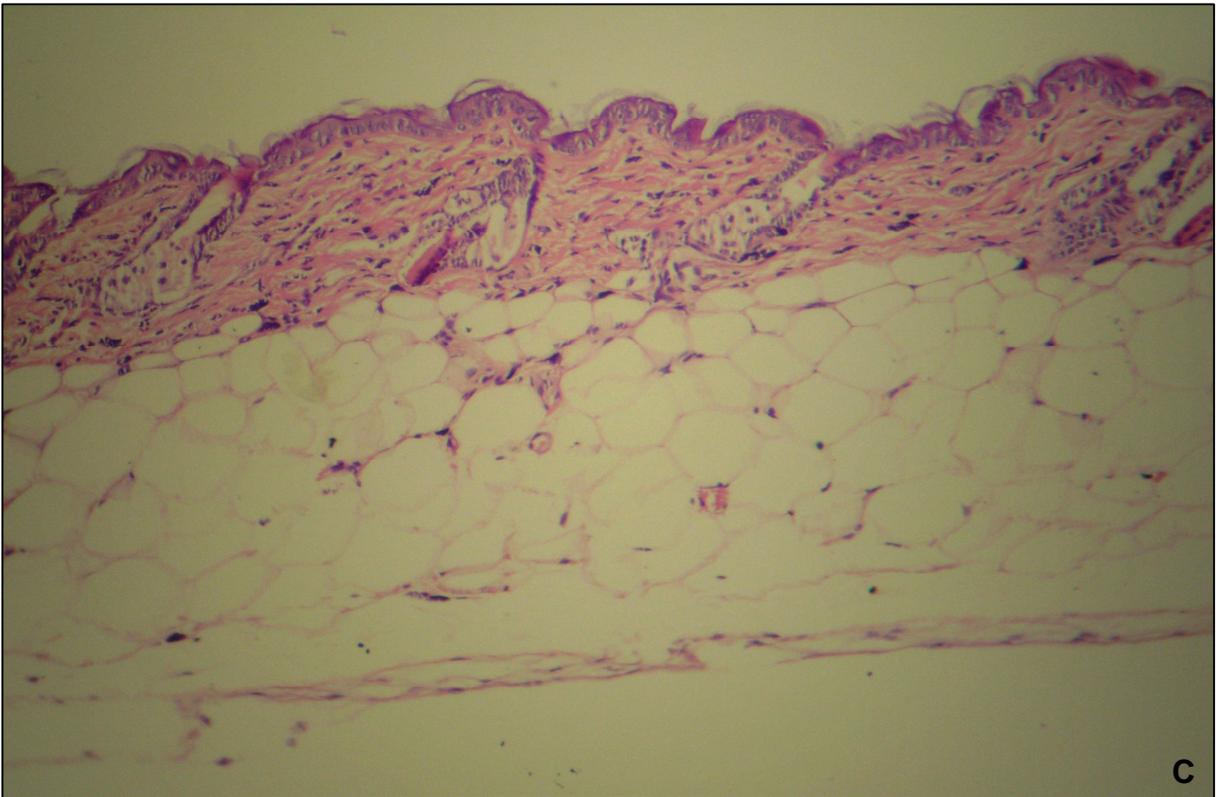
APÊNDICE 04 – ASPECTO HISTOPATOLÓGICO DO GRUPO CONTROLE-
ESPARADRAPO. AUMENTO DE 10x

- A) Aspecto após duas horas da aplicação;
- B) Aspecto após quatro horas da aplicação e
- C) Aspecto após doze horas da aplicação.





B



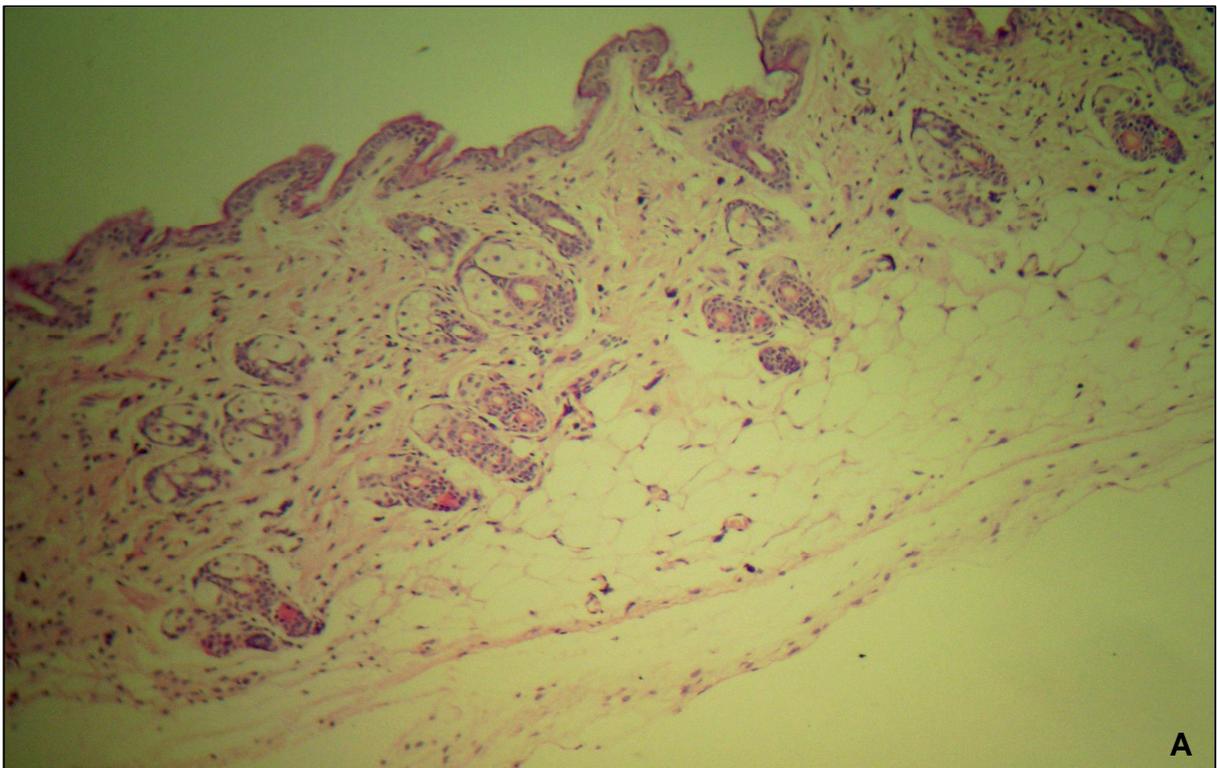
C

APÊNDICE 05– ASPECTO HISTOPATOLÓGICO DO TEGUMENTO DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM APLICAÇÃO DE ESPONJAS MACERADAS. AUMENTO DE 10X.

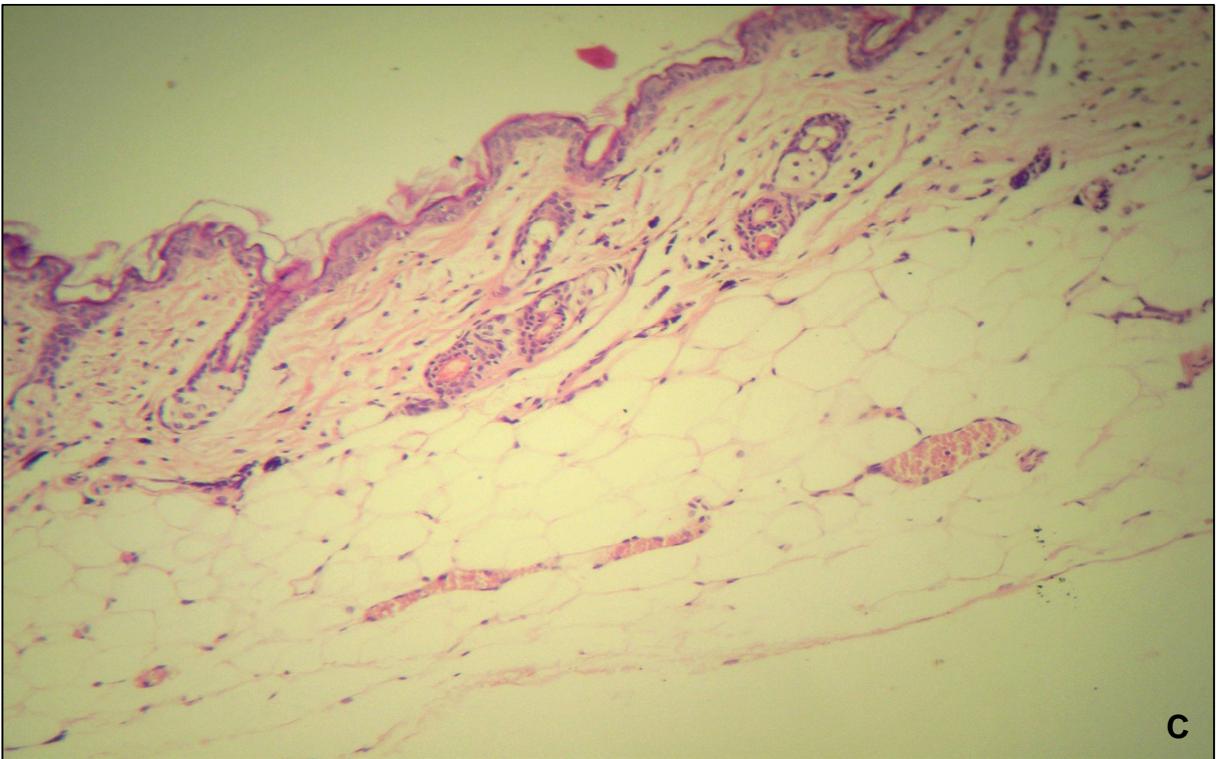
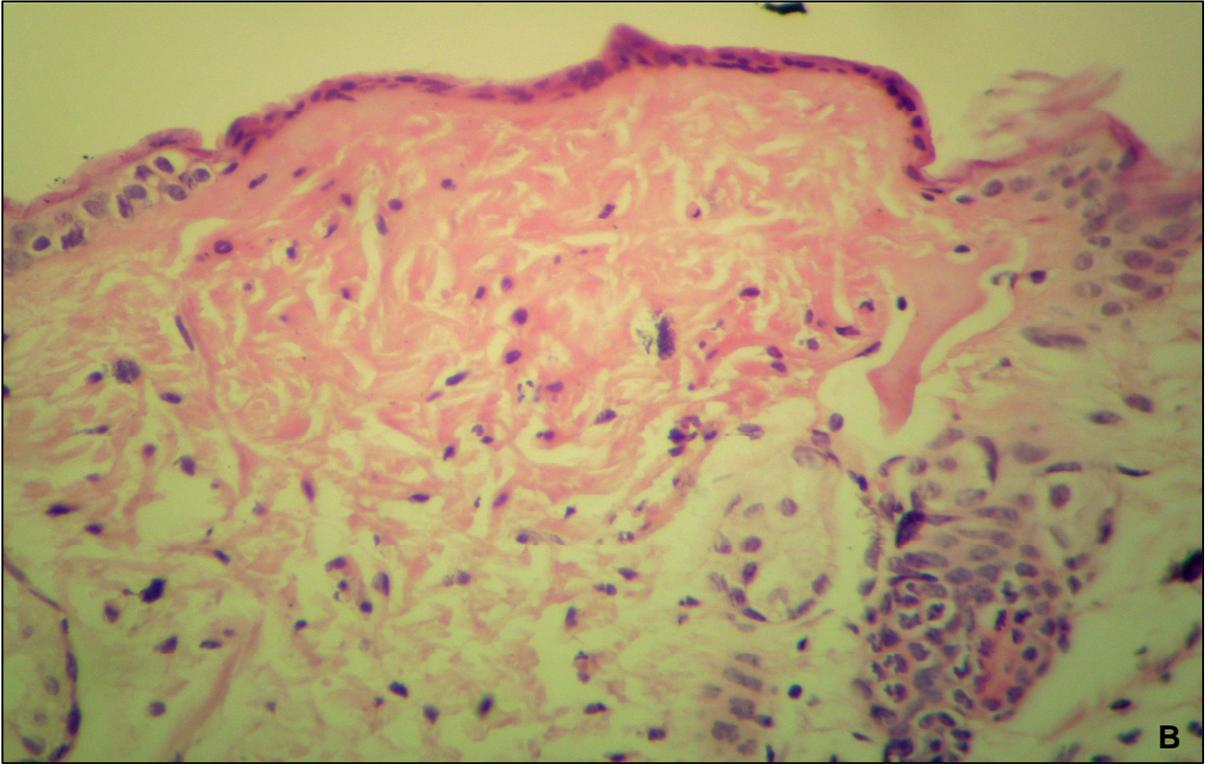
A) Aspecto após duas horas da aplicação;

B) Aspecto após duas horas da aplicação e

C) Aspecto após duas horas da aplicação.

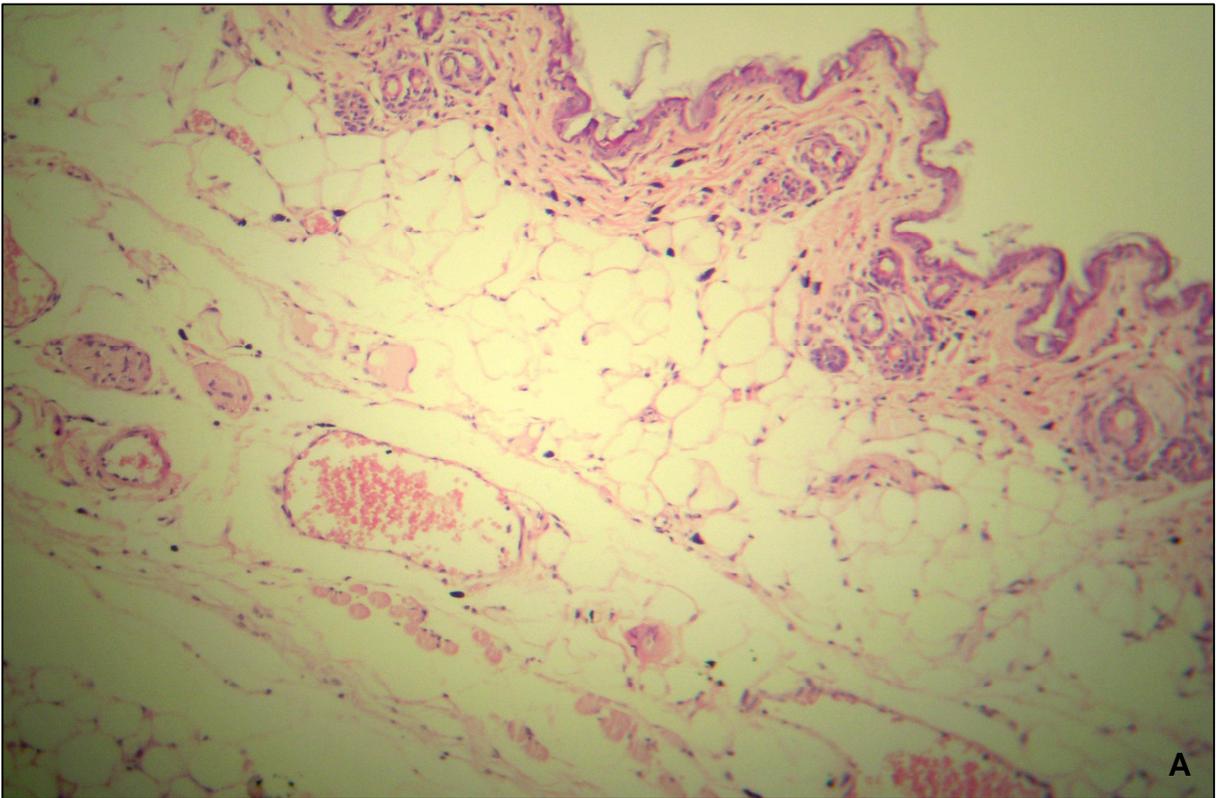


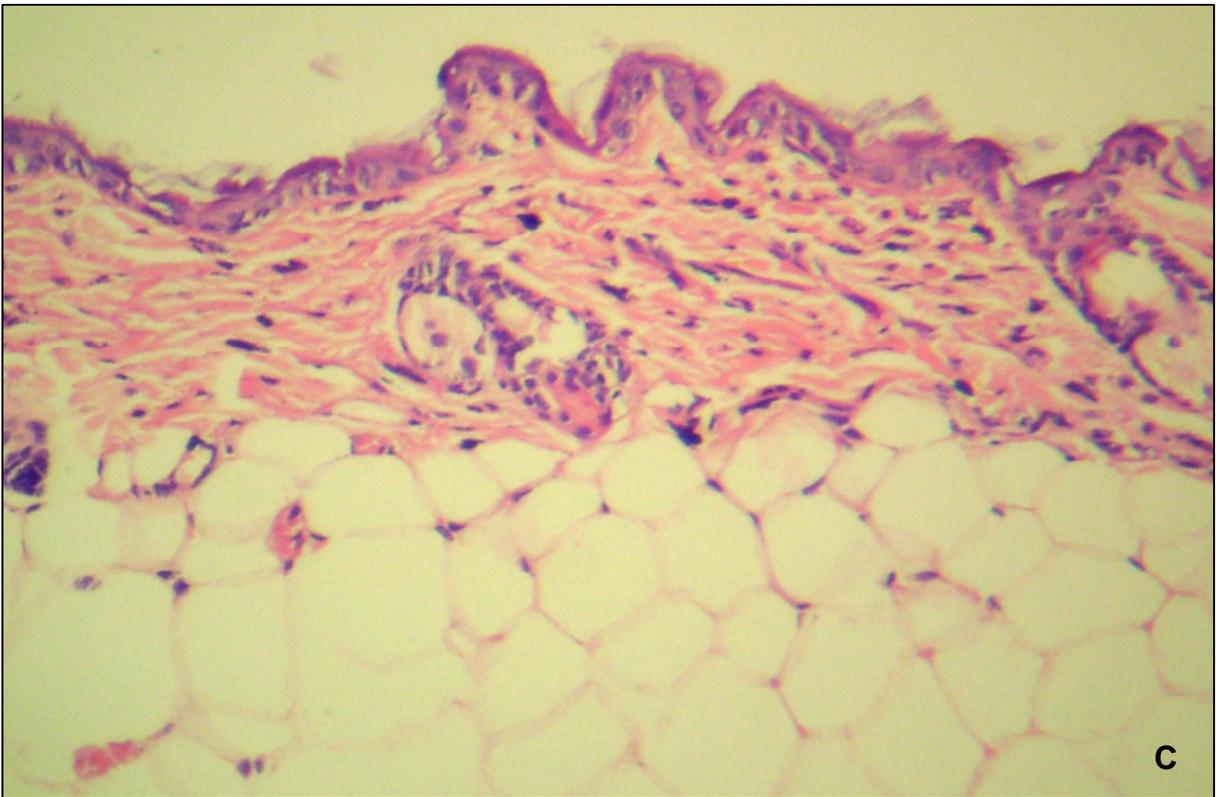
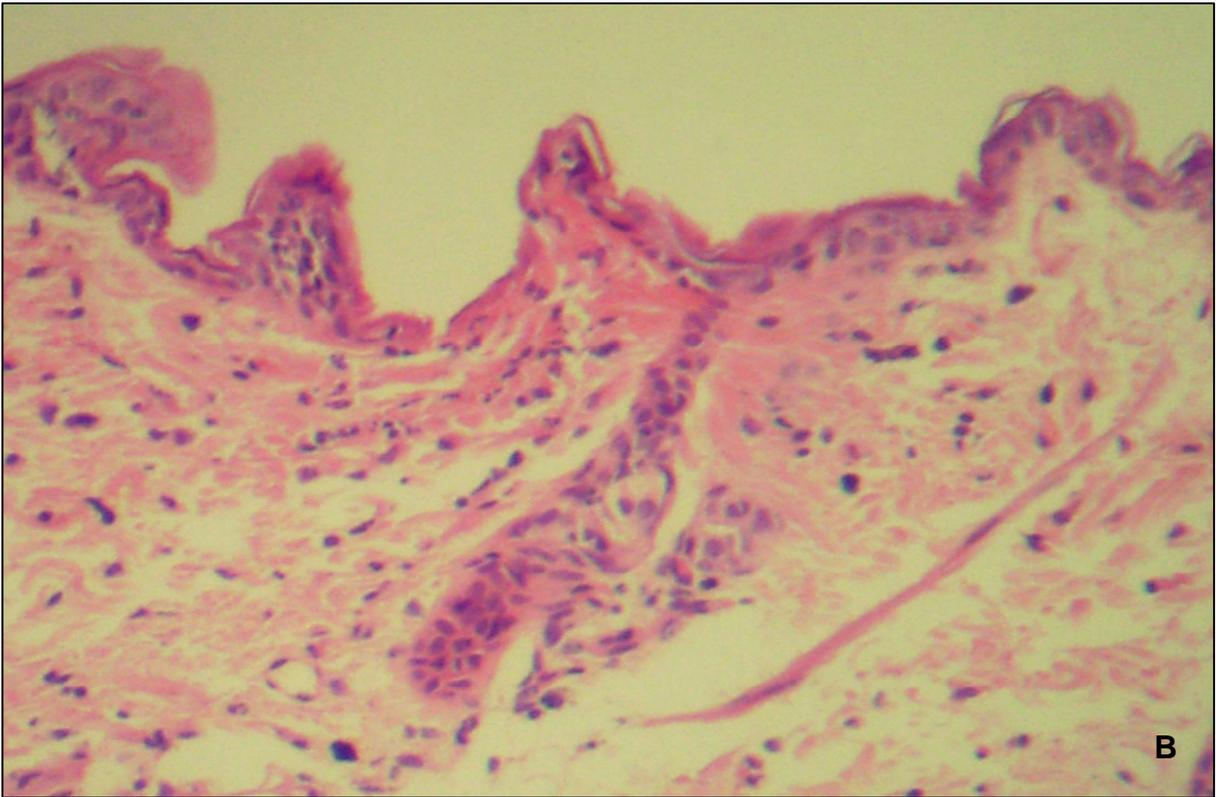
A



APÊNDICE 06 – ASPECTO HISTOPATOLÓGICO DO TEGUMENTO DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM APLICAÇÃO DE ESPONJAS ÍNTEGRAS. AUMENTO DE 10X.

- A) Aspecto após duas horas da aplicação;
- B) Aspecto após quatro horas da aplicação e
- C) Aspecto após doze horas da aplicação.





APÊNDICE 07 – ASPECTO HISTOPATOLÓGICO DO TEGUMENTO DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM APLICAÇÃO DE ESPÍCULAS ISOLADAS. AUMENTO DE 10X.

- A) Aspecto após duas horas da aplicação;
- B) Aspecto após quatro horas da aplicação e
- C) Aspecto após doze horas da aplicação.

