



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS NO BERBIGÃO
ANOMALOCARDIA BRASILIANA PARA O MONITORAMENTO DA
QUALIDADE AMBIENTAL DA RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA
DO PIRAJUBAÉ, FLORIANÓPOLIS/SC

DANIELLE FERRAZ MELLO

Florianópolis
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS NO BERBIGÃO
ANOMALOCARDIA BRASILIANA PARA O MONITORAMENTO DA
QUALIDADE AMBIENTAL DA RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA
DO PIRAJUBAÉ, FLORIANÓPOLIS/SC

DANIELLE FERRAZ MELLO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Margherita Anna
Antonia Maria Barracco, Departamento
de Biologia Celular, Embriologia e
Genética, CCB, UFSC.

Florianópolis
2009

Agradecimentos

Meus agradecimentos sinceros a todos que, diretamente ou não, contribuíram para a elaboração desse trabalho. Em especial, gostaria de agradecer:

À minha orientadora Dra. Margherita Anna Barracco primeiramente por me aceitar em seu laboratório bem no início da graduação, quando ainda não tinha conhecimento algum na área da pesquisa e pela orientação com grande dedicação, apoio e incentivo durante esses mais de três anos de trabalho juntas. Por permitir que eu desenvolvesse uma área totalmente nova em nosso laboratório, sem o auxílio direto de alunos da pós-graduação, e pela confiança depositada em mim neste processo. Por se tornar, além de orientadora, uma grande amiga, sempre preocupada com o meu bem estar não apenas no ambiente de trabalho, mas também na vida pessoal. Para mim, você é um grande exemplo como pessoa e como profissional, principalmente no que diz respeito à paixão que você nos transmite e que tem pela Biologia. Realmente orientadores como você são extremamente raros!

À todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído, nem que a contribuição fosse “apenas” aguentar o aroma agradável dos animais submetidos à anóxia morrendo dentro do laboratório!!! Às muitas risadas e companheirismo que para mim são as características mais marcantes do nosso grupo e que eu vou levar sempre em minha memória!

Ao Eduardo Cargnin-Ferreira pela co-orientação e colaboração neste trabalho e acima de tudo por possibilitar a minha entrada para a área da Ecotoxicologia.

À Christiane Guertler pela sua colaboração com a determinação da produção de espécies reativas de oxigênio.

Ao “seu Neri” o pescador simpático e de muito bom coração que realizou as coletas do berbigão na Costeira do Pirajubaé, pelos divertidos passeios de barco e pelas agradáveis conversas. E também à sua família, a qual eu tive o privilégio de conhecer e que é composta por pessoas muito queridas, que eu espero não perder o contato.

À Fazenda Marinha Atlântico Sul na pessoa de Nelson Silveira Júnior por fornecer os berbigões que passaram pelo período de depuração.

À UFSC e CNPq pela bolsa fornecida durante dois anos através do programa de Iniciação Científica BIP-UFSC/PIBIC-CNPq.

Aos meus queridos amigos Bá, Li, Lari, Má, Ph, Diego, Lobato, Andrézinho, Alê (meu primeiríssimo amigo do curso) que contribuíram cada um de forma única e especial na minha vida durante a graduação, pelos vários momentos de alegria e também pelo apoio nos momentos mais difíceis várias vezes fazendo o papel da família que estava longe! Aos meus mais novos amigos, mas já íntimos e de total confiança, Aida, Nati, Oliver, Julio, Tulio, Caleb, Vagner e Liza que tiveram grande participação na minha vida nos dois últimos semestres da graduação, pelo amor, carinho, alegrias e palavras de incentivo.

Ao Rafa que foi a pessoa que acompanhou mais de perto toda a minha trajetória no curso e com quem eu sempre pude contar durante todo esse período. Pela grande colaboração realizada neste trabalho, principalmente no que diz respeito ao auxílio nos longos dias de coleta que muitas vezes se estendiam até altas horas da madrugada! Pelos momentos imensamente felizes que passamos juntos nesses anos todos e pelo imenso carinho demonstrado por mim (recíproco!). Também sou eternamente grata a você!

À minha família pela qual eu tenho um amor tão grande que nunca conseguiria descrever em apenas algumas palavras! À minha mãe Mirian que sempre me passou todo amor, carinho e cuidado que um filho precisa e muito mais. Ao meu pai Sergio que sempre foi um exemplo pra mim de paciência (principalmente comigo!) e de dedicação à família, nunca deixando que nada nos faltasse, principalmente amor e carinho! Á Bianca que não só é uma

super irmã, mas também minha melhor amiga, conselheira e uma pessoa com um coração de ouro que eu admiro muito. Ao Robson, o mais novo integrante da família, pelo carinho demonstrado por mim e acima de tudo por fazer minha irmã feliz!

Em especial aos meus queridos avós Aglaís e Daniel que foram as pessoas que mais acreditaram em mim, pelo apoio constante mesmo à grande distância com palavras de incentivo, amor e carinho e por fornecer todo o suporte necessário para que eu tivesse uma boa educação.

E por fim a Deus, que em poucas palavras é a razão da minha existência, pelas ricas bênçãos que eu recebi e que certamente não mereço.

Resumo

A Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), e conseqüentemente os seres vivos que ali habitam há longo tempo, vem sendo ameaçados devido ao despejo de efluentes domésticos não tratados na baía onde esta Reserva se localiza. O berbigão *Anomalocardia brasiliiana* é o mais importante recurso pesqueiro da REMAPI, constituindo a principal fonte de renda de várias famílias de pescadores artesanais que vivem na sua vizinhança. Por ter hábito sésil e filtrador, o berbigão representa um interessante modelo biológico para estudos ecotoxicológicos. O principal objetivo deste estudo foi o de comparar alguns parâmetros hemato-imunológicos em populações de *A. brasiliiana* provenientes de 3 localidades durante o inverno e o verão: REMAPI (grupos R1 e R2); áreas vizinhas à REMAPI sob impacto antropogênico por efluentes domésticos (grupos E1 e E2); e uma fazenda de cultivo (Ribeirão da Ilha), onde os berbigões da REMAPI são transplantados para depuração (grupo D); como ferramenta de avaliação da qualidade ambiental desta Reserva. Os parâmetros analisados foram: contagem total (THC) e diferencial de hemócitos (DHC), porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleos (Ap), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e concentração de proteínas totais (CP), título aglutinante (TA) e atividade da fenoloxidase (PO) da hemolinfa. Foram ainda analisados a resistência dos animais à anóxia (RA) e seu índice de condição (IC). Nos pontos de coleta foram ainda monitoradas algumas variáveis ambientais e a presença de coliformes fecais. Nossos resultados mostraram que o número de coliformes fecais nos pontos impactados por efluentes domésticos estava muito acima do permitido (CONAMA n°274/2000). Os animais provenientes destes pontos (E1 e E2) mostraram-se curiosamente pouco afetados pela condição local, apesar do ponto E2 ter apresentado uma diminuição da célula mais imunocompetente ou hemócito granular (HG; 5% menos), um aumento de sua CP, e uma tendência a uma menor THC, quando comparado com um dos grupos da REMAPI (R1). Estes resultados poderiam ser decorrentes de uma adaptação fisiológica dos berbigões a este ambiente cronicamente contaminado, uma vez que vivem nestas condições há longo tempo. Outro resultado interessante refere-se aos animais em depuração (grupo D). Estes animais apresentaram um estado fisiológico bastante debilitado devido à sua baixa RA em relação aos outros grupos. Além disso, apresentaram uma alta produção basal de EROs e tendências a alterações em outros parâmetros imunológicos, em comparação aos grupos da REMAPI. Estes resultados poderiam resultar do fato de que os berbigões são depurados em lanternas de cultivo em suspensão na coluna d'água. Como em seu ambiente natural estes animais vivem enterrados no sedimento, o estresse causado pela permanência em lanternas pode ser a causa dessas alterações. Um terceiro resultado interessante refere-se às diferenças sazonais encontradas. As principais diferenças nos imunoparâmetros entre os grupos de estudo, foram evidenciadas apenas no verão. Além disso, no verão foram observadas alterações no hemograma dos animais (menor THC e maior porcentagem de HGs) em relação ao inverno. Estes resultados corroboram o fato do verão ser um período de estresse para os animais, assim como já descrito em outros bivalves, devido a fatores múltiplos como elevadas temperaturas, desenvolvimento reprodutivo e maior proliferação de microorganismos na água. Em conclusão, a REMAPI apresenta ainda uma aparente boa qualidade ambiental, assim como seus recursos pesqueiros extraídos, apesar de sua proximidade à zona de despejo de efluentes domésticos. Fica, no entanto, um claro alerta sobre o risco de contaminação deste importante ecossistema e seus recursos pesqueiros em vista da sua relativa proximidade a áreas de alta influência antropogênica, sem tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Berbigão, *Anomalocardia brasiliiana*, parâmetros hemato-imunológicos, monitoramento ambiental, Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Poluição e Ecotoxicologia Aquática	10
1.2 Biomarcadores	10
1.3 Uso de bivalves no monitoramento ambiental	12
1.4 O sistema imune de bivalves.....	13
1.5 Utilização do sistema imune como marcador de contaminação.....	16
1.6 Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI).....	16
1.7 O berbigão (<i>Anomalocardia brasiliana</i>).....	17
2. OBJETIVOS E METAS.....	19
2.1 Objetivo	19
2.2 Metas	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Material Biológico e Local de Coleta.	20
3.2 Delineamento Experimental	20
3.3 Teste de resistência a anóxia (RA)	21
3.4 Determinação do Índice de Condição (IC)	21
3.5 Coleta da hemolinfa	22
3.6 Caracterização dos hemócitos ao Microscópio de Contraste de Fase (MCF).....	22
3.7 Hemograma: Contagem total (THC) e diferencial de hemócitos (DHC)	23
3.8 Determinação da concentração total de proteínas (CP).....	23
3.9 Determinação do título aglutinante (lectinas) da hemolinfa (TA)	23
3.10 Detecção da atividade da fenoloxidase (PO).....	23
3.11 Determinação da porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleo (Ap).....	23
3.11 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	24
3.12 Análise Estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Variáveis ambientais e quantificação de coliformes fecais	26
4.2 Determinação do índice de condição (IC)	28
4.3 Resistência à anóxia (RA)	29
4.4 Caracterização de hemócitos ao Microscópio de Contraste de Fase (MCF).....	31
4.5 Hemogramas: contagem total (THC) e diferencial dos hemócitos (DHC).....	31

<i>4.6 Determinação da porcentagem de apoptose (Ap)</i>	34
<i>4.7 Determinação do título aglutinante (lectinas) da hemolinfa (TA)</i>	35
<i>4.8 Concentração de proteínas totais na hemolinfa (CP)</i>	36
<i>4.9 Detecção da atividade da PO</i>	37
<i>4.10 Produção intracelular de ânion superóxido pelos hemócitos</i>	38
<i>4.11 Avaliação das diferenças sazonais</i>	39
5. INTEGRAÇÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

Índice de Figuras e Tabelas

<i>Figura 1. Representação esquemática da ordem de resposta a xenobiontes dentro de um sistema biológico.</i>	11
<i>Figura 2. Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos após reconhecimento de patógenos.</i>	14
<i>Figura 3. Localização dos pontos de coleta dos berbigões.</i>	21
<i>Figura 4. Índice de condição (IC).</i>	28
<i>Figura 5. Teste de resistência à anóxia (RA).</i>	30
<i>Figura 6. Caracterização dos tipos de hemócitos de berbigão.</i>	31
<i>Figura 7. Contagem total de hemócitos (THC).</i>	32
<i>Figura 8. Porcentagem de hemócitos granulares (HGs).</i>	33
<i>Figura 9. Porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou com micronúcleo (Ap).</i>	35
<i>Figura 10. Título aglutinante (TA).</i>	36
<i>Figura 11. Concentração de proteínas totais (CP).</i>	37
<i>Figura 12. Produção intracelular de ânion superóxido (ERO).</i>	38
<i>Figura 13. Análise sazonal dos imunoparâmetros.</i>	40
<i>Tabela 1. Variáveis ambientais dos cinco pontos de coleta.</i>	26
<i>Tabela 2. Contagem de coliformes fecais (Número mais provável ou NMP/100mL) dos cinco pontos de coleta.</i>	27

Lista de abreviaturas

Ap: *Apoptose e/ou micronúcleo*

CP: *Concentração Proteica*

DHC: *Contagem Diferencial de Hemócitos*

ERO: *Espécies Reativas de Oxigênio*

HG: *Hemócito Granular*

HH: *Hemócito Hialino*

HT: *Hemolinfa Total*

IC: *Índice de Condição*

LA70: *número de dias necessários para observação de 70 % de letalidade nos berbigões mantidos em anóxia*

MCF: *Microscópio de Contraste de Fase*

NMP: *Número Mais Provável*

PC: *Peso da Concha*

PO: *Fenoloxidase*

proPO: *pró-fenoloxidase*

PRP: *Proteínas de Reconhecimento de Padrões*

PSC: *Peso Seco da Carne*

RA: *Resistência à anóxia*

REMAPI: *Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé*

TA: *Título Aglutinante*

THC: *Contagem Total de Hemócitos*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição e Ecotoxicologia Aquática

A intensa atividade humana decorrente do alto nível de industrialização, da atividade agrícola e do aumento da densidade populacional tem aumentado de forma significativa o lançamento de dejetos e resíduos nos corpos d'água. Este quadro criou a necessidade de uma detecção precoce dos danos causados por esses lançamentos, enquanto o ambiente ainda não está num estado tão severo de contaminação. Essa necessidade impulsionou o surgimento de uma nova ciência de caráter multidisciplinar, que vem sendo reconhecida em nível mundial como capaz de fornecer os instrumentos necessários à prevenção destes impactos nos ecossistemas: a *Ecotoxicologia*. O termo *Ecotoxicologia* foi sugerido pela primeira vez em 1969, pelo toxicologista René Truhaut, sendo definido, depois de alguns anos de discussão entre os cientistas, em poucas palavras, como o estudo dos efeitos de uma ou mais substâncias estranhas ao ambiente em questão (xenobiontes) sobre os organismos que ali vivem, incluindo a interação destas substâncias com o meio ambiente (ZAGATTO, 2008).

A Ecotoxicologia é uma ciência ainda muito jovem, o que a torna uma área muito promissora para o desenvolvimento de inúmeras investigações sobre o efeito e mecanismo de ação dos xenobiontes nos seres vivos. Até poucas décadas atrás, esse conhecimento era unicamente baseado em testes de toxicidade realizados em laboratório, que quantificavam a sensibilidade de organismos a compostos individuais (PRÓSPERI & NASCIMENTO, 2008). Estes estudos, entretanto, apresentam muitas vezes uma relevância limitada, no contexto ambiental, uma vez que não prevêm as ações interativas dos vários compostos ou xenobiontes presentes no ambiente, ou seja, as ações de sinergismo, ou ainda os fatores ambientais (MOORE et al., 2004; PRÓSPERI & NASCIMENTO, 2008).

1.2 Biomarcadores

A maioria das perturbações ambientais ocorre de maneira lenta e contínua, expondo o ecossistema a níveis subletais de contaminantes. Por outro lado, sabe-se que as respostas biológicas nos organismos afetados manifestam-se, inicialmente a nível bioquímico-celular. Pode-se, assim, prever os efeitos destes contaminantes a longo prazo nos organismos, através de estudos que se baseiam nos menores níveis de sua organização como os níveis bioquímico, histológico e fisiológico (Fig. 1). Desta forma, uma das aplicações mais promissoras da Ecotoxicologia é a detecção precoce

dos efeitos adversos nos ecossistemas mediante o uso de biomarcadores nos organismos que ali habitam (NASCIMENTO et al., 2008).

Outra forma de avaliar o impacto de xenobiontes sobre um determinado ecossistema seria do ponto de vista ecológico. Neste caso se analisaria as alterações da estrutura e função das comunidades e ecossistemas (NASCIMENTO et al., 2008). Contudo, apesar destas análises apresentarem, sem dúvida, uma maior relevância ecológica do que o uso de biomarcadores nos níveis mais basais (Fig. 1), tais determinações são difíceis, pois requerem dados prévios dos padrões normais das populações antes da ação antropogênica no ambiente, o que é muitas vezes inviável devido à longa e ampla ação antrópica. Sendo assim, torna-se difícil demonstrar o declínio das populações aquáticas, a não ser que essas manifestações sejam súbitas ou se dêem quando o ambiente já apresenta um nível de contaminação bastante elevado (LEVINTON, 1995). A utilização de biomarcadores de contaminação ambiental desponta, assim, como uma alternativa viável, promissora e que se antecipa a efeitos a níveis populacionais e ecológicos. Possibilitando assim, o uso de medidas mitigatórias que visem a interrupção da emissão dos contaminantes.

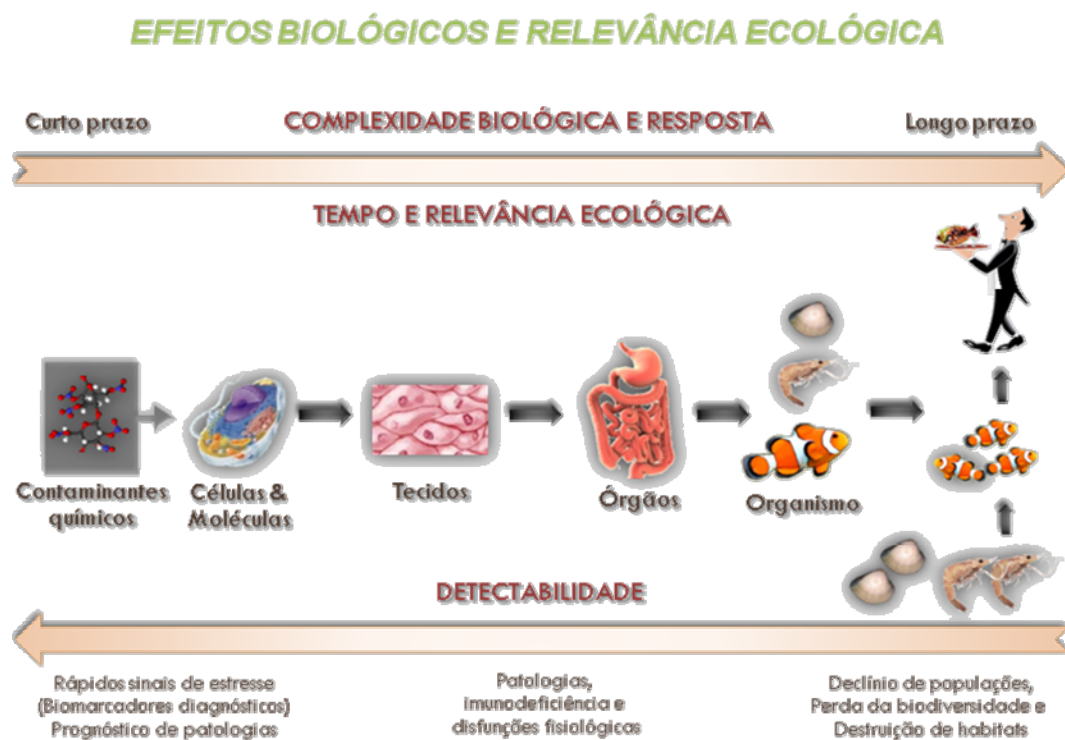


Figura 1. Representação esquemática da ordem de resposta a xenobiontes dentro de um sistema biológico. Ao se estudar a resposta a xenobiontes nos níveis de organização de elevada complexidade biológica, apesar da sua maior relevância nos ecossistemas, a sua detectabilidade é prejudicada devido à grande interferência por múltiplos fatores. Já nos níveis biológicos mais basais, há uma rápida resposta à perturbação, com menor interferência e com capacidade de previsibilidade (biomarcadores), o que é fundamental para estudos ecotoxicológicos. Adaptado de MOORE et al. (2004).

Biomarcadores são atualmente definidos como respostas biológicas adaptativas a fatores de estresse, evidenciadas através de alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou

comportamentais (MONSERRAT et al., 2007). Eles podem ser classificados como de exposição, de efeito ou de susceptibilidade. Os *biomarcadores de exposição* estimam a dose interna de um composto ou de seus derivados em um organismo exposto. Como exemplos podemos citar: a indução de metalotioneínas mediante exposição a metais e a indução do citocromo P4501A monoxidase mediante exposição a hidrocarbonetos poliaromáticos. Os *biomarcadores de efeito*, em geral, não são específicos para os xenobiontes, mas demonstram efeitos adversos no organismo, que podem ser mensurados por parâmetros bioquímicos, fisiológicos, comportamentais, entre outros. Caracterizam-se pela indução de mecanismos de defesa celular como, por exemplo, a indução de enzimas antioxidantes ou indução de proteínas de estresse (hsp - *heat shock proteins*). Estes tipos de biomarcadores, assim como os de exposição, resultam numa resposta a um estresse que pode ser reversível, quando o agente estressante não estiver mais atuando, a não ser que a capacidade de resposta do sistema ultrapasse seu limite. Por fim, os *biomarcadores de susceptibilidade* indicam processos que podem causar variações nas respostas dos organismos de uma mesma espécie, aos xenobiontes. Entre os biomarcadores de susceptibilidade estão: sexo, tamanho, estágio de desenvolvimento e polimorfismos genéticos de uma população (NASCIMENTO et al., 2008).

1.3 Uso de bivalves no monitoramento ambiental

Vários estudos vêm sugerindo a utilização de bivalves no monitoramento da qualidade ambiental dos sistemas costeiros marinhos (WOOTTON et al., 2003; ANDRAL et al., 2004; AUFFRET et al., 2006; DE ALMEIDA et al., 2007; ZHOU et al., 2008). Isto se deve, principalmente, ao fato destes moluscos possuírem hábito sésil e filtrador, estando constantemente sujeitos, sem possibilidade de fuga, a diferentes tipos de xenobiontes e outros fatores de estresse na água onde vivem. Além destas características, os bivalves ainda possuem muitas outras que os tornam bons bioindicadores de contaminação ambiental como: ampla distribuição geográfica, tolerância a alterações ambientais e a vários tipos de contaminantes, populações freqüentemente grandes e estáveis, vida relativamente longa, resistentes o bastante para sobreviverem em laboratório e gaiolas em estudos de campo e capacidade de bioacumulação de poluentes (ZHOU et al., 2008). Esta última característica, por sua vez, é muito explorada em estudos ecotoxicológicos, pois pode representar um fator agravante da toxicidade, uma vez que a concentração de xenobiontes no interior do animal acaba sendo muitas vezes maior do que a do próprio ambiente (FENT, 2004). Frente a estas características, os bivalves vêm sendo cada vez mais usados em programas de monitoramento ambiental.

1.4 O sistema imune de bivalves

O sistema imune dos bivalves está restrito a uma imunidade inata ou natural, diferentemente dos vertebrados que possuem além deste, uma imunidade adaptativa que inclui uma infinidade de receptores e anticorpos altamente específicos e células de memória. O sistema de defesa desses animais está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa, onde existem células circulantes chamadas hemócitos que são os responsáveis pelas reações imune celulares e uma variedade de proteínas plasmáticas relacionadas às respostas imune humorais. Ambas as reações atuam de forma integrada, protegendo os moluscos contra infecções e garantindo sua homeostase (vide revisões de VARGAS-ALBORES & BARRACCO, 2001 e BARRACCO & DA SILVA, 2008). A fagocitose de microorganismos, a formação de nódulos e cápsulas em torno de patógenos e sua posterior degradação por mecanismos líticos e degradativos constituem as principais respostas imune realizadas pelos hemócitos. Já os fatores humorais incluem proteínas de reconhecimento capazes de identificar padrões moleculares específicos presentes na superfície dos patógenos (PRP: do inglês, *pattern recognition proteins* e PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*) e uma série de moléculas imunoefetoras que levam a neutralização ou destruição dos patógenos invasores (vide revisão de BARRACCO & DA SILVA, 2008) (vide Fig. 2).

Um importante mecanismo de destruição de patógenos invasores é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são moléculas muito instáveis que contem um ou mais elétrons desemparelhados reagindo rapidamente com compostos próximos como membranas, sendo assim altamente tóxicas e microbicidas (ANDERSON et al., 1997). Essa produção ocorre quando microorganismos ou parasitas, que entram em contato com a membrana do hemócito durante os processos de fagocitose e encapsulamento (vide Fig. 2), ativam estas células de defesa levando a um aumento do consumo intracelular de oxigênio (choque respiratório). A produção de ERO inicia-se com a ativação de um sistema enzimático, denominado NADPH oxidase, que está associado às membranas dos fagócitos e também na membrana lisossomal e catalisa a redução do oxigênio molecular para ânion superóxido (O_2^-). Este, por sua vez, pode ser convertido espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, sob a ação da enzima mieloperoxidase e em presença de cloro, pode gerar o ácido hipocloroso (HOCl) que é, por sua vez, um agente microbicida potente. Além destes compostos, podem ainda ser geradas outras ERO, como o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o oxigênio singlet (1O_2) que também apresentam efeitos citotóxicos e microbicidas. Cabe, contudo, salientar, que paralelamente a sua ação microbicida potente, estes oxidoradicaís, podem também acarretar danos importantes aos tecidos do próprio hospedeiro. Para neutralizar este efeito, existem mecanismos de defesa antioxidantes, que podem ser tanto enzimáticos como não enzimáticos e atuam na eliminação das ERO ou na transformação destes radicaís em produtos menos tóxicos. Os antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas C, E e o β -caroteno, são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos via alimentação. Já, os antioxidantes

enzimáticos são sintetizados pelo próprio organismo e incluem uma série de enzimas, como a glutationa-peroxidase, a catalase e a já mencionada SOD (vide revisão de BARRACCO & DA SILVA, 2008).

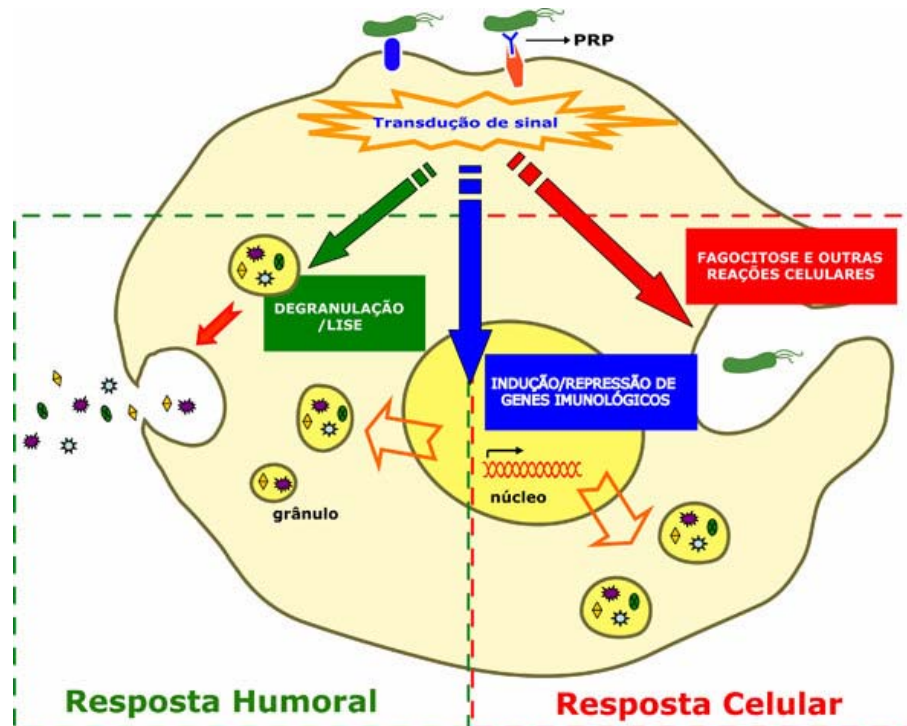


Figura 2. Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos após reconhecimento de patógenos, via PRPs plasmáticas ou celulares, e subsequente ativação: (1) degranulação, com liberação de diferentes imunofatores e imunoreguladores (figuras geométricas sendo liberadas ou presentes no interior dos grânulos); (2) indução e/ou repressão de genes imunológicos; (3) ativação de respostas celulares como fagocitose e formação de nódulos e cápsulas. (BARRACCO et al., 2008).

Dentre as proteínas humorais, destacam-se as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas de reconhecimento padrão ou PRPs, com capacidade de reconhecer especificamente carboidratos da superfície de patógenos, dando início às respostas imunoefetoras como a aglutinação de microrganismos invasores e/ou à sua fagocitose facilitada ou opsonização (MARQUES & BARRACCO, 2000). A ocorrência destas moléculas na hemolinfa de bivalves foi extensamente relatada (vide revisão de BARRACCO & DA SILVA, 2008).

Outro importante mecanismo de defesa em invertebrados é o sistema pró-fenoloxidase (proPO). Este mecanismo foi essencialmente estudado em artrópodes, nos quais a ativação deste sistema inicia-se após indução por componentes da superfície de microrganismos, como as β -glicanas da superfície de fungos, lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanas da superfície de bactérias Gram negativas e Gram positivas respectivamente. Inicia-se então uma cascata proteolítica mediada por serino-proteases, que culmina na ativação da enzima fenoloxidase (PO) a partir de sua pró-forma proPO. Uma vez ativada, a PO promove a oxidação de compostos fenólicos, como a tirosina e o L-DOPA, dando origem a compostos tóxicos intermediários como as quinonas e ERO e gerando como composto final o pigmento escuro melanina. Os intermediários tóxicos produzidos durante este processo de melanização são os principais agentes imunoefetores responsáveis pelo controle das infecções. A

presença de melanina é comumente observada nas reações celulares de defesa, como no encapsulamento de parasitas e cicatrização de ferimentos dos artrópodes (VARGAS-ALBORES & BARRACCO, 2001; CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2004). Apesar do sistema proPO ter sido muito bem estudado em artrópodes, o conhecimento deste sistema em moluscos é ainda escasso e os resultados encontrados são bastante inconsistentes (vide revisão de BARRACCO & DA SILVA, 2008).

Como mencionado anteriormente, os hemócitos são os principais efetores imunocelulares. De modo geral, são reconhecidos dois tipos celulares básicos em bivalves: hemócitos granulares (HGs), que apresentam grânulos em seu citoplasma e hemócitos hialinos (HHs) com poucos ou nenhum grânulo em seu interior. O HG é o tipo celular que aparentemente apresenta uma maior participação nas respostas de defesa em comparação ao HH. Desta forma, o hemograma dos bivalves, representado pela contagem total e diferencial de hemócitos (THC – *Total Hemocyte Count* e DHC – *Differential Hemocyte Count*) funciona como um dos imunoparâmetros mais amplamente utilizados para expressar as condições de saúde destes moluscos (vide revisão de BARRACCO & DA SILVA, 2008), apesar das amplas variações intrapopulacionais e intraespecíficas. Uma vez que o HG é considerado o tipo celular mais imunocompetente, a sua proporção na hemolinfa é um importante indicativo do estado de saúde dos bivalves.

A concentração total de proteínas (CP) na hemolinfa pode também funcionar como indicador imunológico de condição de saúde em bivalves uma vez que a ativação dos hemócitos induz a liberação de proteínas imunoefetoras para o plasma (BARRACCO & DA SILVA, 2008). A CP estudada em diversos bivalves mostrou uma grande variabilidade natural dentro da mesma espécie (FISHER et al., 1996; BARTH et al., 2005; FORD & PAILLARD, 2007) ou em associação à presença de patógenos e xenobiontes na água (PICKWELL & STEINERT, 1984; FORD & HASKIN, 1987; CHU & LAPEYRE, 1989; AUFFRET et al., 2006; ORDAS et al., 2007).

Outro mecanismo importante tanto para a regulação da homeostase de um organismo quanto para sua defesa, é a morte celular programada ou apoptose dos hemócitos. A indução de apoptose inicia-se em resposta a uma variedade de estímulos endógenos ou exógenos, incluindo diferentes fatores de estresse e envolve várias alterações morfológicas celulares, como a condensação da cromatina, a fragmentação do núcleo, o *blebbing* da membrana (formação de pequenas vesículas), o encolhimento celular e finalmente a fragmentação da célula em pequenas vesículas revestidas por membrana, denominadas corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são em geral rapidamente reconhecidos e fagocitados pelas células vizinhas ou macrófagos sem desencadear uma resposta inflamatória (TERAHARA & TAKAHASHI, 2008). Entre os fatores de estresse que podem promover a indução da apoptose em hemócitos de bivalves pode-se citar alguns microorganismos, poluentes, salinidade e temperatura (TERAHARA & TAKAHASHI, 2008).

1.5 Utilização do sistema imune como marcador de contaminação

Como mencionado anteriormente, os biomarcadores são classificados como de *exposição, efeito* ou *susceptibilidade*. Dentre os *biomarcadores de efeito*, utilizados em estudos ecotoxicológicos, pode-se destacar o sistema imunológico. Em particular, o sistema imune inato dos invertebrados, devido à sua relativa simplicidade, tem se mostrado potencialmente sensível e ao mesmo tempo acessível para utilização em programas de monitoramento ambiental (GALLOWAY & DEPLEDGE, 2001). Apesar da importância do sistema imune inato para a sobrevivência desses organismos e do consenso de que esse sistema pode ser modulado pela presença de xenobiontes no ambiente, apenas recentemente este tema recebeu a devida atenção. Sendo assim, existem relativamente poucos estudos nesta área, o que a torna muito promissora dentro da Ecotoxicologia (vide revisões de BAIER-ANDERSON & ANDERSON, 2000; GALLOWAY & DEPLEDGE, 2001; MYDLARZ et al., 2006). Dentre os poucos trabalhos que relacionam imunoparâmetros de invertebrados e o efeito de xenobiontes, a grande maioria corresponde a ensaios em laboratório, havendo poucos estudos que utilizam estes parâmetros no monitoramento ambiental *in situ* (vide revisões de GALLOWAY & DEPLEDGE, 2001; MYDLARZ et al., 2006).

Dentre os parâmetros imunológicos mais utilizados, a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) têm se mostrado, de forma geral, bastante sensíveis para estudos ecotoxicológicos (vide revisão de BAIER-ANDERSON & ANDERSON, 2000). No entanto, outros parâmetros como o hemograma, a atividade específica da enzima fenoloxidase e a concentração de proteínas na hemolinfa também são comumente utilizados (vide revisões de BAIER-ANDERSON & ANDERSON, 2000; GALLOWAY & DEPLEDGE, 2001; MYDLARZ et al., 2006). Além destes parâmetros, os lisossomos dos hemócitos de bivalves também têm se mostrado sensíveis a poluentes de várias naturezas, pois perdem a estabilidade de suas membranas, prejudicando assim a degradação de microorganismos invasores (NASCIMENTO et al., 2008).

Uma das maiores justificativas para se estudar o sistema imune dos invertebrados dentro do contexto de contaminação ambiental, reside no fato de muitos estudos terem revelado que os xenobiontes são responsáveis pelo aumento da incidência de doenças desses animais. Isto se deve ao fato de que estes compostos afetam adversamente a imunidade dos mesmos, tornando-os mais suscetíveis a infecções o que pode resultar em altas mortalidades (vide revisão de MYDLARZ et al., 2006).

1.6 Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI)

A Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), localizada na chamada Baía Sul da Ilha de Santa Catarina (27°38'56"S e 48°32'31"W), foi criada em 1992 a partir de um projeto iniciado

por quinze famílias de pescadores artesanais da Costeira do Pirajubaé, sob a orientação do IBAMA/CNPT, onde foi implantada uma fazenda marinha de berbigões (*Anomalocardia brasiliiana*). A REMAPI possui uma área total de 1.444 ha, dos quais 740 ha são de manguezais do Rio Tavares, e os 704 ha restantes pertencem ao Baixio da Tipitinga (IBAMA, 2009).

A REMAPI consiste numa área de grande importância ecológica, uma vez que seu bioma dominante é o manguezal, berçário favorável para o desenvolvimento de muitas espécies animais e vegetais. Pode-se destacar em sua vegetação característica, a gramínea de mangue (*Spartina alterniflora*), a Siriúba (*Avicennia sp.*), o mangue branco (*Laguncularia sp.*) e o mangue vermelho (*Rhizophora sp.*). Além da espécie de destaque da Reserva, o berbigão *A. brasiliiana*, ocorrem também duas espécies de camarão rosa, *Penaeus paulensis* e *P. brasiliensis* e o camarão branco, *P. schmitti*, além de outras espécies de crustáceos como siris e carangueijos. Entre os peixes, destacam-se a tainha (*Mugil brasiliensis*) e o parati (*M. curema*). A Reserva abriga também várias espécies de aves marinhas e migratórias, que utilizam o manguezal como abrigo (IBAMA, 2009).

A importância de se fazer o monitoramento ambiental da Reserva reside no elevado risco de contaminação por efluentes domésticos que ela potencialmente enfrenta, uma vez que se localiza próxima a áreas onde há inúmeras tubulações por onde são lançados efluentes domésticos sem tratamento ao mar, oriundos das comunidades ribeirinhas do Saco dos Limões e Costeira que ocupam esta região de forma desordenada. O lançamento de efluentes domésticos no ambiente *in natura* é fonte importante de aporte de metais, compostos orgânicos, pesticidas (CICCOTELLI et al., 1998) e atualmente, tem-se detectado novas classes de poluentes como compostos farmacêuticos, hormônios e drogas ilícitas (TERZIC et al., 2008; ZUCCATO et al., 2008). Desta forma, estes xenobiontes podem estar afetando adversamente as espécies que compõem o ecossistema associado à REMAPI, trazendo conseqüências muitas vezes irreparáveis.

1.7 O berbigão (*Anomalocardia brasiliiana*)

O berbigão *A. brasiliiana* (GMELIN, 1791) é um molusco bivalve lamelibrânquio da família Veneridae que se distribui desde as Índias Ocidentais até o Uruguai, ocorrendo ao longo de toda a costa brasileira (RIOS, 1994). No município de Florianópolis, assim como em outras regiões brasileiras, o berbigão possui uma considerável importância nos ecossistemas naturais e também de cunho sócio-econômico, pois constitui a única fonte de renda estável para muitas famílias de pescadores artesanais (IBAMA, 2009).

Esta espécie encontra-se enterrada superficialmente (até 10 cm) em substrato lodoso ou arenolodoso, tanto na borda de manguezais, quanto em faixas entremarés e infralitoral raso, onde ficam protegidas da ação de ondas e de correntes (MOUEZA et al., 1999). De acordo com SCHAEFFER-NOVELLI (1976), esta espécie não tem predileção por um determinado intervalo de temperatura,

sendo, portanto euritérmica. É também eurihalina, sendo encontrada em uma grande amplitude de salinidades (ESTRADA, 2004). Apesar de resistentes a condições anóxicas (SCHAEFFER-NOVELLI, 1976), as populações de *A. brasiliiana* são sensíveis a variações ambientais e podem sofrer grandes mortalidades em período de grande volume de chuvas, por exemplo (MOUEZA et al., 1999).

Como dito anteriormente, os bivalves representam um importante grupo animal para utilização em estudos ecotoxicológicos. Sendo assim, o berbigão nativo *A. brasiliiana* poderia constituir uma importante ferramenta no biomonitoramento da qualidade ambiental da REMAPI.

2. OBJETIVOS E METAS

2.1 Objetivo

O principal objetivo deste estudo foi o de comparar alguns parâmetros hemato-imunológicos em populações de berbigões *A. brasiliiana* provenientes de 3 localidades: (a) Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), Florianópolis, SC; (b) áreas sob impacto antropogênico por efluentes domésticos vizinhas à REMAPI e, (c) animais transplantados em água do mar para depuração, como ferramenta na avaliação da qualidade ambiental da REMAPI.

2.2 Objetivos específicos

1. Comparar algumas variáveis ambientais como pH, salinidade e temperatura da água dos diferentes pontos de estudo.
2. Quantificar a presença de coliformes fecais na água dos diferentes pontos de estudo.
3. Comparar o índice de condição (relação entre o peso seco da carne e da concha) das populações de berbigão dos diferentes pontos.
4. Comparar sua resistência a anóxia.
5. Comparar seu hemograma (contagens totais e diferenciais de hemócitos).
6. Comparar a porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleo.
7. Comparar o título aglutinante (lectinas) de sua hemolinfa.
8. Comparar a concentração de proteínas totais de sua hemolinfa.
9. Comparar a ativação da enzima fenoloxidase.
10. Comparar a capacidade de seus hemócitos em produzir espécies reativas de oxigênio.
11. Verificar se existem diferenças sazonais nos parâmetros estudados.
12. Fazer uma avaliação global do estado de saúde dos berbigões dos diferentes pontos e da qualidade ambiental da REMAPI.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico e Local de Coleta.

Os animais foram obtidos de quatro pontos localizados na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina (27°38'56''S e 48°32'31''W), sendo dois no interior da Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), a aproximadamente 1,5 km da costa (grupos R1 e R2) e os outros dois pontos em locais próximos à reserva, a aproximadamente 100 m da costa (grupos E1 e E2) (Fig. 3). Próximo aos pontos E1 e E2 existem tubulações por onde escoam efluentes domésticos *in natura*. Durante o experimento, um grupo de berbigões oriundo de um dos pontos da REMAPI foi transplantado para a Fazenda Marinha Atlântico Sul (Gerente: Nelson Silveira Júnior) situada no Ribeirão da Ilha (27°48'13''S e 48°33'14''W) onde a água é sabidamente própria para cultivo e sua qualidade é monitorada periodicamente (grupo D, Fig. 3). Os animais foram mantidos em lanternas de cultivo submersas, por um período mínimo de 72 h para depuração antes de serem analisados (LENOCH, 2003). Cabe salientar que esta fazenda de cultivo já realiza rotineiramente a coleta de berbigões da REMAPI para depuração e posteriormente para venda.

Os animais utilizados neste trabalho provenientes da REMAPI e das áreas vizinhas potencialmente impactadas foram adquiridos de um pescador artesanal da região.

3.2 Delineamento Experimental

Para os parâmetros imunológicos foram utilizados 30 animais de cada ponto selecionado, perfazendo um total de 150 berbigões. As variáveis ambientais, temperatura, salinidade e pH foram monitoradas nos locais de amostragem, no dia da coleta. Além disso, foram coletadas amostras da água de cada ponto de estudo em frascos estéreis e levadas imediatamente ao laboratório QMC SANEAMENTO LTDA, onde foi quantificado o NMP (número mais provável) de coliformes fecais por 100 mL de amostra. De acordo com este laboratório a quantificação foi realizada pela técnica de tubos múltiplos de acordo com as normas técnicas da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) L5. 202 - Método de ensaio de coliformes totais e fecais. Os berbigões foram transportados ao Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura (LIAA) e mantidos em aquários de 20 L, contendo água do mar, sob aeração constante, com temperatura ambiente e fotoperíodo natural, por 24-48h (aclimatação). Após a aclimatação, os animais foram utilizados para coleta de hemolinfa e determinação dos parâmetros hemato-imunológicos.

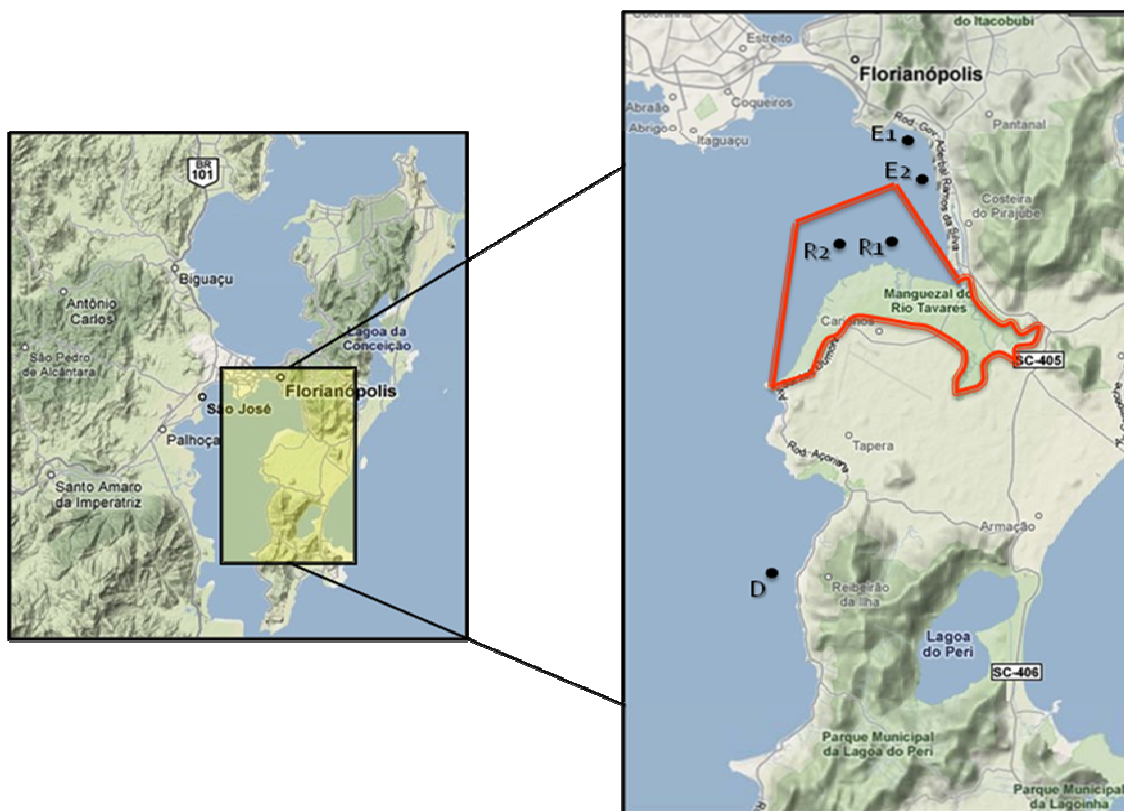


Figura 3. Localização dos pontos de coleta dos berbigões (*Anomalocardia brasiliana*) na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina (Florianópolis). A linha vermelha corresponde aos limites da Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (adaptado de IBAMA, 2009).

Foram ainda utilizados animais para realizar um teste de resistência à anóxia ($n=30$ animais por ponto), para a determinação do índice de condição ($n=20$ animais por ponto) e para determinação da produção de ERO ($n=9$ animais por ponto).

Este estudo foi realizado durante o período de dois anos. Neste período foram feitas quatro coletas, sendo duas coletas durante o inverno (15 de setembro de 2007 e 12 de setembro de 2008) e duas durante o verão (25 de fevereiro de 2008 e 5 de fevereiro de 2009).

3.3 Teste de resistência a anóxia (RA)

Os animais de cada grupo foram medidos (comprimento da concha), marcados individualmente (caneta para retroprojektor) e mantidos fora da água em bandejas umedecidas, sob temperatura constante de 23-25 °C e fotoperíodo natural, sendo a mortalidade registrada pontualmente a cada 24h.

3.4 Determinação do Índice de Condição (IC)

O IC dos berbigões ($n=20$ animais) foi determinado a partir do peso seco da carne do animal (PSC) e do peso da concha (PC):

$$IC = PSC \times 100/PC$$

Para obtenção do PSC e PC, os animais foram dissecados para separação da carne e da concha, que em seguida foram levadas à estufa a 100 °C por 24 h e 2 h, respectivamente e posteriormente pesadas em balança digital de precisão de 0,001g.

3.5 Coleta da hemolinfa

As valvas dos animais foram semi-abertas com auxílio de um bisturi e a hemolinfa retirada do músculo adutor anterior pela inserção de uma seringa estéril de 1 ml acoplada a uma agulha 25x7 mm. A hemolinfa coletada foi tratada de diferentes maneiras de acordo com o ensaio experimental a ser realizado, sendo que cada animal teve sua hemolinfa extraída apenas uma vez.

Para identificar e caracterizar os hemócitos, determinar os hemogramas e as taxas de apoptose celular, parte da hemolinfa extraída (5 *pools* de 6 animais para cada grupo) foi imediatamente transferida para microtubos contendo solução fixadora (formaldeído 4 % em solução de Alsever modificada ou MAS: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0), numa diluição conhecida e mantidas a 4 °C.

A fim de obter a concentração total, o título aglutinante e detectar a atividade da fenoloxidase da hemolinfa dos berbigões, outra parte da hemolinfa coletada (5 *pools* de 6 animais para cada grupo) foi preparada para a obtenção de uma fração, que será aqui denominada de *hemolinfa total* (HT). Para tal, a hemolinfa extraída foi imediatamente congelada (-20 °C) e, quando oportuno, levada a um aparelho ultrasonicador durante três intervalos de 7 s cada (22,5 kHz/50 W a 0 °C), para permitir a lise e liberação do conteúdo celular. Após sonicação, a hemolinfa foi centrifugada a 8.000 g por 30 min, para remoção dos detritos celulares, e o sobrenadante assim obtido constituiu a HT (plasma + produtos excitados pelos hemócitos). Todas as amostras de HT foram congeladas a -20 °C e usadas quando oportuno.

Por fim, o restante da hemolinfa (3 *pools* de 3 animais para cada grupo) foi centrifugado a 800 g por 10 min, a fim de se obter somente a fração celular, sendo esta imediatamente utilizada na determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).

3.6 Caracterização dos hemócitos ao Microscópio de Contraste de Fase (MCF)

Amostras de hemolinfa fixadas, como acima descrito, foram depositadas em finas camadas entre lâmina e lamínula e levadas ao MCF para observação, identificação e registro fotográfico dos tipos de hemócitos presentes.

3.7 Hemograma: Contagem total (THC) e diferencial de hemócitos (DHC)

A THC foi estimada em câmara de Neubauer, a partir das amostras fixadas de hemolinfa. Já a porcentagem relativa dos hemócitos ou DHC foi determinada a partir da observação de esfregaços de hemolinfa fixada sob o MCF, sendo analisadas 200 células por lâmina.

3.8 Determinação da concentração total de proteínas (CP)

A CP foi estimada nas amostras de HT com base no método de Bradford, (1976) utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão. As análises de cada amostra foram realizadas em triplicata.

3.9 Determinação do título aglutinante (lectinas) da hemolinfa (TA)

Amostras de 50 µl de HT foram diluídas serialmente em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,4), em microplacas de 96 poços (fundo em U). Cada poço recebeu, então, 50 µl de uma suspensão de eritrócitos de cão a 2% em TBS-1. Nos controles, a HT foi substituída por TBS-1. As placas foram incubadas em câmara úmida por 2-3 h a 20 °C e o TA foi expresso como o recíproco da maior diluição em que ainda é observada a reação de aglutinação. As análises de cada amostra foram realizadas em duplicata.

3.10 Detecção da atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da PO foi determinada incubando-se amostras (50µL) de HT com igual volume do substrato enzimático L-DOPA (3 mg .mL⁻¹) e TBS-2 (50 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7,6) em microplacas de 96 poços (fundo chato). A indução de uma maior atividade de PO foi investigada, realizando o ensaio acima descrito, em pH fortemente básico (TBS-2, pH 9,0). A formação do pigmento vermelho-coral DOPAcromo foi monitorada em leitora de microplaca a 490 nm, após 5, 10, 15 e 20 min. No controle, a HT (branco) foi substituída por TBS-2. A atividade específica da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U), através da variação da absorbância por minuto e por mg de proteína (U mg⁻¹ de proteína), sendo que uma (1) unidade de atividade enzimática equivale ao aumento de 0,001 na absorbância por minuto a 20 °C (SÖDERHÄLL & HÄLL, 1984). As análises de cada amostra foram realizadas em triplicata.

3.11 Determinação da porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleo (Ap)

A Ap foi analisada nos *pools* de hemolinfa fixada e quantificada através do corante de Hoechst 33258, que permite visualizar as alterações do núcleo celular (lobulação, fragmentação e micronúcleo)

por fluorescência. Para tal, esfregaços de hemolinfa foram imersos em tampão Mc Ilvane (0,1 M ácido cítrico, 0,4 M fosfato de sódio) por 5 min e transferidos para uma solução de bisbenzimidazina em tampão Mc Ilvane (1:2000) por aproximadamente 3-5 min. As lâminas foram então montadas com lamínulas e observadas ao microscópio de fluorescência (365 nm). Foram analisadas 200 estruturas nucleares por amostra.

3.11 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A hemolinfa dos animais (3 *pools* de 3 animais) foi centrifugada a 800 g por 10 min (4 °C), para obtenção dos hemócitos. O número de hemócitos foi ajustado para 10^6 células.mL⁻¹ (câmara de Neubauer), utilizando-se TBS-3 (Tris 50 mM, 0,03 % CaCl₂, 3 % NaCl, 0,1 % de BSA, pH 8,4) como diluente. A produção específica do ânion superóxido (O₂⁻) pelos hemócitos foi quantificada através da técnica de redução do composto NBT (*nitroblue tetrazolium*) que gera, intracelularmente, o precipitado azul de formazan. Como ativador celular, foi utilizado laminarina (β-1,3 glicanas). Amostras de 100 μl da suspensão de hemócitos (10^6 células.mL⁻¹) foram adicionadas aos diferentes poços de uma microplaca de 96 poços (fundo chato) e as células foram deixadas aderir por 15 a 30 min à temperatura ambiente em câmara úmida, sendo a adesão monitorada em microscópio invertido. Após duas lavagens com TBS-3, as monocamadas celulares foram incubadas com 0,3 % NBT e 0,15 % de laminarina diluídos em 100 μl de TBS-3, por 15 min, no escuro, a 25 °C. O sobrenadante foi então, removido e as monocamadas tratadas com metanol absoluto por 10 min. As placas foram então lavadas em metanol 70% três vezes e secadas em temperatura ambiente. A seguir, cada poço recebeu uma solução de KOH (120 μl, 2 M) e DMSO (140 μl) para solubilizar o azul de formazan citoplasmático e após pipetagem repetitiva, o conteúdo dos poços foi transferido para uma microplaca nova e limpa (adaptado de PIPE, 1992). Nos controles, a laminarina ou o NBT foram substituídos por TBS-3. A produção específica do ânion superóxido foi avaliada adicionando-se a enzima superóxido dismutase (SOD – 600 U.mL⁻¹ em 2 % NaCl, Sigma) ao TBS-3, em alguns ensaios. A análise quantitativa foi realizada em uma leitora de microplaca a 630 nm e as absorbâncias registradas. As análises de cada amostra foram realizadas em quadruplicata.

3.12 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros THC, DHC, PO, TA, IC e Ap foram analisados pelo teste ANOVA de uma via ($p < 0,05$), enquanto os resultados da produção de ERO foram

submetidos ao teste ANOVA de duas vias. Estes testes foram seguidos do teste de comparação de médias de Tuckey. O test-T de Student foi aplicado na comparação sazonal entre os diferentes parâmetros. Os valores em porcentagem (DHC, Apop) foram transformados para arcoseno. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism® versão 5.00.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, foram feitas quatro coletas num período de dois anos, sendo duas realizadas no inverno (2007 e 2008) e duas no verão (2008 e 2009). Os resultados obtidos nestes dois anos foram considerados em conjunto, invernos e verões, para facilitar a interpretação, uma vez que não houve diferenças significativas nos dois anos. Alguns parâmetros, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o índice de condição (IC), foram analisados apenas no verão, uma vez que este período parece ser crítico para vários bivalves, quando ocorrem as conhecidas “mortalidades de verão” (THIELTGES, 2006; SAMAIN et al., 2007; TRAVERS et al., 2008). Esta maior vulnerabilidade no verão parece estar ligada a vários fatores, incluindo temperaturas elevadas e estresse fisiológico associado à maturação gonadal e gametogênese, o que torna os animais mais susceptíveis a infecções por microorganismos patogênicos e/ou oportunistas presentes na água (GOULLETQUER et al., 1998; TRAVERS et al., 2008). Frente a este fato, optamos por avaliar alguns parâmetros extras no verão, além dos propostos para o inverno.

4.1 Variáveis ambientais e quantificação de coliformes fecais

As variáveis ambientais realizadas no dia das coletas se mantiveram relativamente constantes nos cinco pontos de estudo como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis ambientais dos 5 locais de coleta de berbigões localizados na baía sul de Florianópolis/SC durante o inverno e verão. R1 e R2- grupos coletados no interior da REMAPI; E1 e E2- grupos coletados nos locais impactados por efluentes domésticos; D- grupo transferido da REMAPI para uma fazenda de cultivo para depuração.

Pontos	Período	Temperatura	Salinidade	pH
R1	Inverno	21,5 °C	32,5 ‰	nd
	Verão	26,2 °C	31,0 ‰	7,9
R2	Inverno	22,0 °C	34,0 ‰	nd
	Verão	26,5 °C	30,5 ‰	7,8
E1	Inverno	22,8 °C	34,0 ‰	nd
	Verão	25,5 °C	30,0 ‰	7,9
E2	Inverno	23,0 °C	35,0 ‰	nd
	Verão	26,5 °C	30,5 ‰	7,9
D	Inverno	20,0 °C	32,0 ‰	nd
	Verão	27,0 °C	31,5 ‰	8,1

nd: não determinado

É conhecido que a flutuação de variáveis ambientais como temperatura e salinidade pode gerar diferentes níveis de estresse e conseqüentemente provocar alterações em alguns parâmetros fisiológicos de moluscos bivalves, incluindo o sistema imune destes (BUTT et al., 2007; MALAGOLI et al., 2007; HEGARET et al., 2008). Contudo, os valores das variáveis ambientais mostraram-se consideravelmente constantes entre os diferentes pontos de coleta, não representando, assim, um fator de estresse diferencial entre os grupos.

A quantificação de coliformes fecais na água dos diferentes pontos estudados confirmou que os locais próximos às tubulações por onde passam os efluentes domésticos (E1 e E2), oriundos da comunidade, ribeirinha local, apresentavam de fato uma quantidade muito alta de coliformes fecais, comparativamente aos pontos da REMAPI e do ponto de depuração, tanto no inverno quanto no verão (Tab. 2). Além do mais, o número de coliformes fecais encontrado nestes dois pontos foi muito superior ao permitido pela resolução CONAMA nº375/2005 que é de 43 NMP/100 mL, o que caracteriza essas áreas como impróprias para extração de pescados. Por outro lado, nossos resultados mostraram que os pontos analisados da REMAPI (R1 e R2) apresentavam uma boa qualidade da água, pelo menos no que diz respeito à presença de coliformes fecais, apesar de se localizarem próximos aos pontos contaminados (E1 e E2). Assim, também, a água da fazenda de depuração (ponto D) não apresentou praticamente coliformes fecais, conforme esperado (Tab.2).

Tabela 2. Contagem de coliformes fecais (Número Mais Provável ou NMP/100 ml) nos 5 pontos de estudo, durante o inverno e o verão.

	Inverno	Verão
CONAMA (máximo previsto)	43	43
R1	0	23
R2	0	3
E1	5×10^4	3×10^3
E2	5×10^4	9×10^3
D	0	4

A contagem de coliformes fecais é um parâmetro amplamente utilizado na detecção de contaminação por efluentes domésticos em ambientes aquáticos. A ocorrência de altos valores de coliformes fecais indica não apenas uma contaminação da água por estas bactérias, mas também por todos os outros poluentes/xenobiontes de origem antrópica mencionados anteriormente, que acompanham os coliformes fecais nos efluentes domésticos. Desta forma, a presença destas bactérias no ambiente aquático revela a presença de uma combinação de contaminantes múltiplos de origem doméstica. Estes contaminantes podem trazer grandes prejuízos aos seres vivos que habitam nestas

áreas e às populações que dependem dos organismos que ali vivem para o seu sustento (PETROVIC et al., 2003).

Pelo fato das áreas contaminadas E1 e E2 estarem muito próximas à REMAPI, existe um sério risco de que esta contaminação atinja a Reserva trazendo prejuízos ao seu ecossistema e seus recursos pesqueiros. Cabe salientar que ainda não existe previsão de implantação de um sistema de tratamento de água nesta região, pelo menos em curto prazo.

4.2 Determinação do índice de condição (IC)

A análise comparativa do IC dos berbigões dos diferentes pontos de coleta revelou que os animais provenientes das regiões impactadas por efluentes domésticos apresentaram os maiores valores de IC (E1= $4,47 \pm 0,21$; E2= $4,64 \pm 0,15$) (Fig.4). Todos os outros grupos apresentaram ICs significativamente mais baixos ($p < 0,05$) e muito semelhantes entre si (R1= $3,59 \pm 0,16$; R2= $3,59 \pm 0,20$; D= $3,71 \pm 0,24$) (Fig.4).

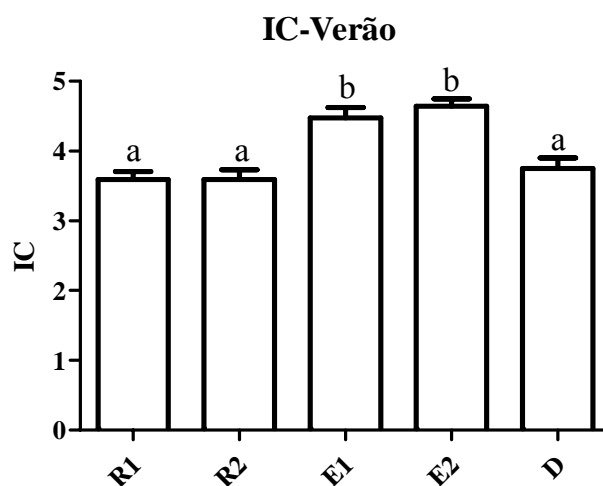


Figura 4. Índice de condição (IC) dos diferentes grupos de berbigões coletados no verão. As barras representam as médias \pm erro padrão de 20 animais em cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

O índice de condição (IC) é considerado um dos melhores indicadores do estado geral do animal para estudos ambientais (BODIN et al., 2004). Alguns estudos demonstraram que o IC pode variar em função da contaminação do ambiente onde habitam (HUMMEL et al., 1997; BODIN et al., 2004; ANDRAL et al., 2004; MOUNEYRAC et al., 2008). No entanto, o IC encontra-se mais frequentemente associado à disponibilidade de alimento no ambiente e à qualidade da dieta dos animais (BODIN et al., 2004). Nossos resultados parecem confirmar este fato, uma vez que contaminação por efluentes domésticos é, reconhecidamente, uma fonte rica em matéria orgânica e os maiores valores de ICs foram justamente encontrados nos grupos provenientes de locais contaminados

por esses efluentes (E1 e E2). No entanto, cabe salientar que apesar dos berbigões dos grupos E1 e E2 apresentarem um maior IC, o que aparenta ser uma característica vantajosa principalmente no que diz respeito à sua comercialização, estes podem conter em seu tecido metais pesados, compostos orgânicos persistentes ou outros contaminantes químicos em concentrações nocivas à saúde do consumidor.

4.3 Resistência à anóxia (RA)

A RA foi analisada estimando-se a LA70, ou seja, o número de dias necessários para observar 70 % de letalidade nos berbigões mantidos em anóxia.

Os resultados mostraram, surpreendentemente, que os animais que sofreram depuração na fazenda marinha de cultivo (ponto D), foram os que menos resistiram ao teste de anóxia, tanto no inverno quanto no verão (Fig. 5). No inverno a LA70 dos animais do grupo D foi de 7 dias e no verão, foi ainda menor, correspondendo à metade da observada no inverno (LA70= 3,5 dias). Já os animais provenientes dos pontos R1 e R2 apresentaram, ambos, uma LA70 de 9 dias no inverno, e no verão, curiosamente o grupo R1 resistiu muito mais que o R2 (R1=12 e R2=6,5 dias). Curiosamente, os grupos E1 e E2, foram os mais resistentes no inverno, revelando uma LA70 de 14 e 16 dias, respectivamente. No entanto, no verão, estes mesmos grupos resistiram muito menos que no inverno e que o grupo R1 (a LA70 de ambos foi de 8 dias) (Fig. 5).

Alguns estudos já revelaram que estresses ambientais podem influenciar a resistência à anóxia de bivalves (WANG et al.; VELDHUIZENTSOERKAN et al., 1991; DE ZWAAN et al., 1995). Acredita-se que isso ocorra devido à tentativa dos animais de se adaptarem a um ou mais fatores estressantes que requer uma maior demanda energética, restando, portanto, menos energia para a realização de suas atividades metabólicas básicas (DE ZWAAN et al., 1995). Desta forma, quando é aplicado um fator de estresse adicional (anóxia) esses animais tendem a sobreviver menos tempo.

Aparentemente a RA não apresentou uma correlação com o IC dos berbigões, já que os grupos R1, R2 e D, que apresentaram valores de IC muito semelhantes no verão, mostraram padrões de RA bastante distintos neste mesmo período. Sendo assim, outros fatores, que não diretamente associados ao IC, devem ter influenciado na RA dos animais e serão discutidos a seguir.

Como mencionado anteriormente, os berbigões provenientes do ponto D passaram por um período de depuração em lanternas de cultivo submersas. Aparentemente, esse tratamento representa um fator de estresse para estes animais, uma vez que seu hábito é de ficar enterrado no sedimento e não de permanecerem suspensos na coluna d'água. Sendo assim, um importante fator de estresse é a emissão frequente do pé pelos berbigões, na tentativa de se enterrarem. Além deste tipo de estresse, este novo habitat, também pode estar associado a fatores de estresse físicos com os quais os animais não estão sujeitos normalmente como, por exemplo, correntes de água e uma maior variação de temperatura na coluna d'água comparativamente ao sedimento. Deste modo, todos estes fatores,

atuando em sinergia, possivelmente levaram os berbigões a uma condição geral de estresse fisiológico, tornando-os mais susceptíveis à anóxia.

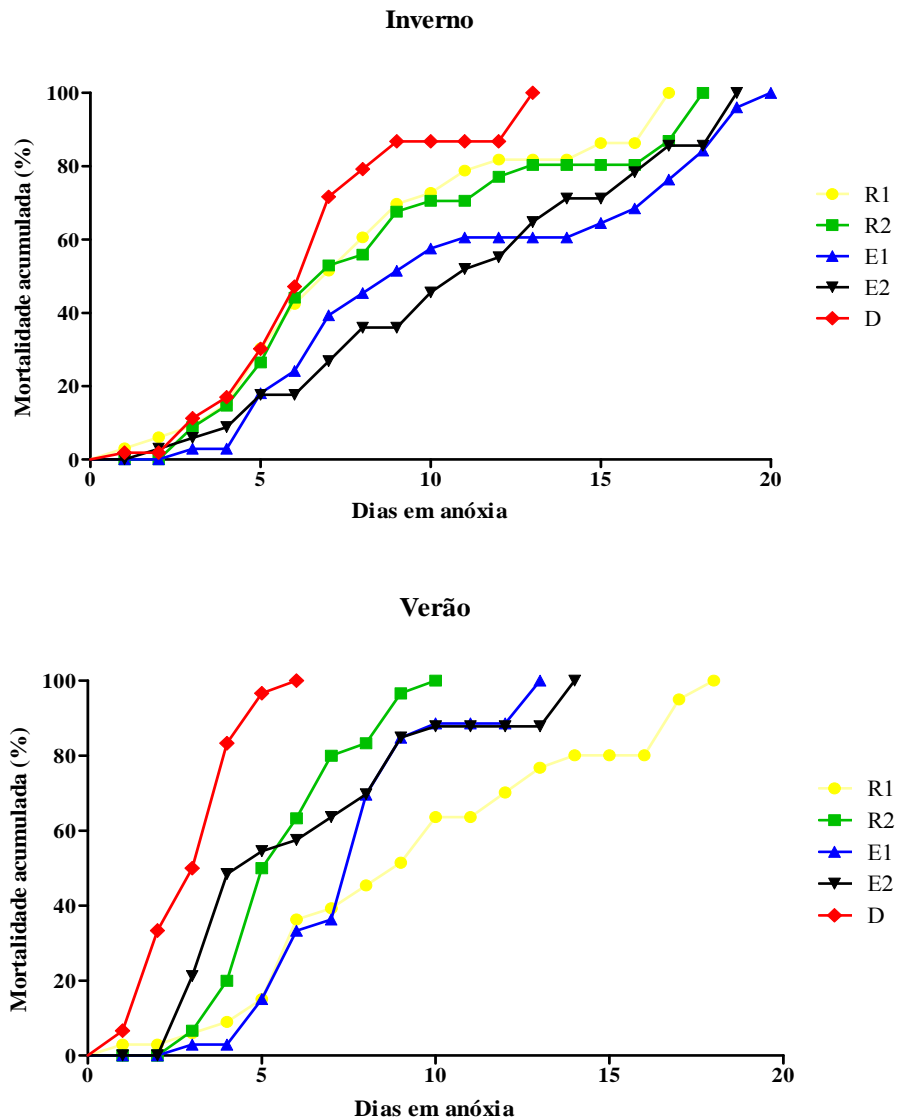


Figura 5. Mortalidade acumulada nos diferentes grupos de berbigões (n= 30 animais por ponto) submetidos ao teste de resistência à anóxia (RA) no inverno e no verão.

Outro ponto a destacar refere-se a maior RA observada nos animais dos grupos E1 e E2, comparativamente aos demais grupos, no inverno. É sabido que, em ambientes contaminados por efluentes domésticos (como confirmado através das análises de coliformes fecais mencionadas anteriormente), o aumento na concentração de nutrientes dissolvidos na água, promove a eutrofização desses ambientes, o que leva a uma baixa concentração de oxigênio dissolvido, principalmente na coluna de água próxima ao substrato, onde há pouca produção primária e alta atividade de degradação de bactérias aeróbicas (LEVINTON, 1995). Sendo assim, por serem animais bentônicos, os berbigões presentes nesses pontos possivelmente estavam mais adaptados à pouca disponibilidade de oxigênio, resistindo, portanto, por mais tempo à anóxia. Outra possível explicação baseia-se na capacidade dos

bivalves em permanecer longos períodos com as valvas fechadas quando em ambientes expostos a contaminantes, como estratégia de proteção (TRAN et al., 2004; LIAO et al., 2005). Nessas condições, os bivalves não podem retirar o oxigênio da água, dependendo apenas do seu metabolismo anaeróbico. Sendo assim, os animais provenientes dos pontos impactados (E1 e E2), estando sujeitos constantemente à contaminantes provenientes dos efluentes domésticos, podem apresentar maior resistência anóxia por ficarem longos períodos com suas valvas fechadas, uma vez que eles não tem a opção de simplesmente migrarem para um ambiente não contaminado.

Já no verão, todos os grupos, com exceção do R1, resistiram muito menos ao teste da anóxia. Como mencionado anteriormente, no verão os bivalves estão sujeitos a outros fatores de estresse como temperaturas elevadas, desenvolvimento reprodutivo e maior proliferação de microorganismos patogênicos e/ou oportunistas que proliferam principalmente no verão (THIELTGES, 2006; SAMAIN et al., 2007; TRAVERS et al., 2008) e que muito provavelmente contribuíram para a diminuição da RA nestes grupos.

4.4 Caracterização de hemócitos ao Microscópio de Contraste de Fase (MCF)

Em bivalves são usualmente reconhecidos dois tipos celulares básicos circulando e sua hemolinfa: hemócitos hialinos (HHs) e hemócitos granulares (HGs) (HINE, 1999). Também em *A. brasiliiana* foram encontradas estas duas populações celulares, a partir de amostras de hemolinfa fixadas e observadas ao MCF (Fig. 6). O HG foi o tipo celular predominante, caracterizando-se pela grande quantidade de grânulos citoplasmáticos refringentes, que usualmente mascaram o núcleo (Fig. 6b). Já os HH são células menores, desprovidas de grânulos e com alta relação núcleo-citoplasmática (Fig. 6a).

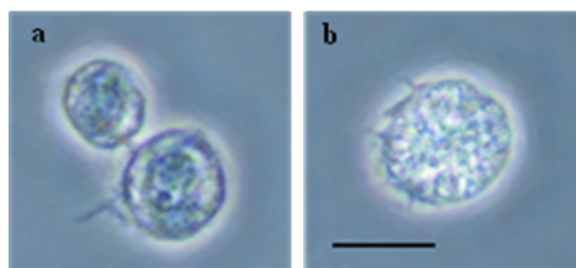


Figura 6. Micrografias de hemócitos de berbigão observados ao microscópio de contraste de fase. a- hemócitos hialinos; b- hemócito granular. A barra equivale a 10 μ m.

4.5 Hemogramas: contagem total (THC) e diferencial dos hemócitos (DHC)

No presente trabalho, os valores da THC dos berbigões não apresentaram, curiosamente, diferenças estatísticas entre os grupos de animais provenientes dos diferentes pontos, tanto no período

do inverno quanto do verão (Fig. 7). No inverno, a THC apresentou valores bastante heterogêneos (R1= $6,8 \pm 0,7$; R2= $6,0 \pm 1,6$; E1= $5,6 \pm 1,2$; E2= $7,1 \pm 1,0$ e D= $6,5 \pm 1,0$ hemócitos. 10^6 .mL⁻¹). Já no período do verão, pode-se observar uma tendência a valores mais elevados nos berbigões do grupo D ($6,4 \pm 0,6$ hemócitos. 10^6 .mL⁻¹) e mais baixos em um dos grupos do ambiente impactado (E2= $3,9 \pm 0,6$ hemócitos. 10^6 .mL⁻¹), quando comparados aos grupos provenientes da REMAPI (Fig. 7).

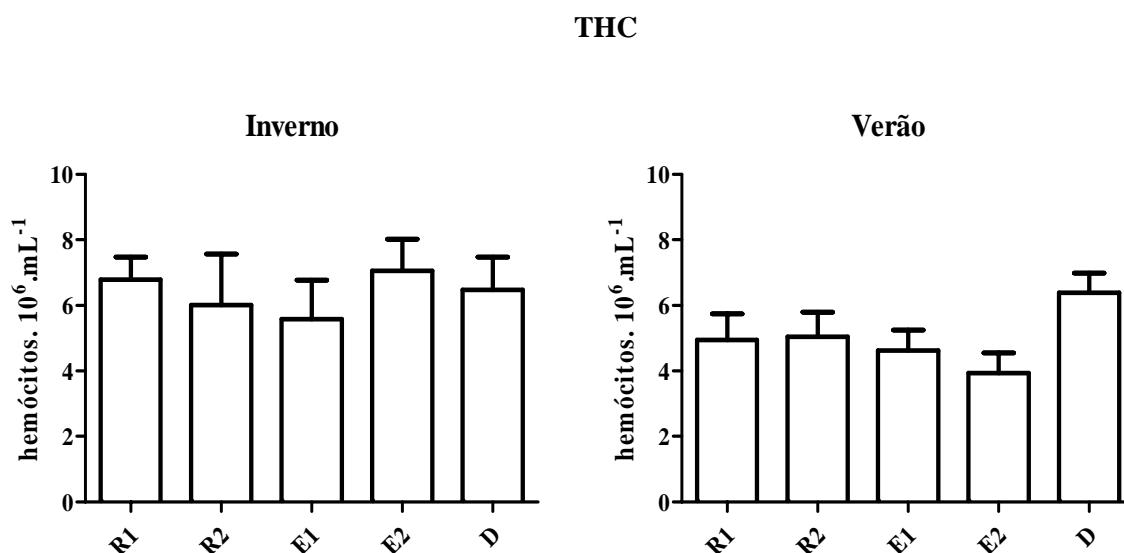


Figura 7. Contagem total de hemócitos (THC) dos diferentes grupos de berbigões coletados no inverno e no verão. As barras representam as médias \pm erro padrão de 10 *pools* de 6 animais em cada grupo.

Os hemogramas são, de modo geral, um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a condição de saúde de bivalves, podendo sofrer variações importantes em função de condições ambientais como fatores de estresse físicos (CHENG et al., 2004b; PARRY & PIPE, 2004; CHEN et al., 2007; MALAGOLI et al., 2007) ou devido à presença de poluentes (PIPE et al., 1999; PARRY & PIPE, 2004; AUFFRET et al., 2006; GAGNAIRE et al., 2006; BADO-NILLES et al., 2008). Quando o efeito destes fatores de estresse é analisado individualmente em animais sob condições controladas de laboratório, os resultados dos hemogramas são usualmente mais homogêneos e menos variáveis. Por outro lado, em estudos de campo, onde as variáveis ambientais, incluindo fatores abióticos e xenobiontes, são inúmeras, os hemogramas tendem a mostrar valores variáveis e heterogêneos, tornando difícil o estabelecimento de conclusões precisas (vide revisão de BAIER-ANDERSON & ANDERSON, 2000). Talvez devido a este fato, que neste estudo foram observadas apenas tendências na THC dos diferentes grupos de berbigões ao invés de diferenças estatisticamente significativas.

A tendência a valores mais altos na THC dos berbigões do grupo D no verão pode ser reflexo do estresse sentido pelos animais por estarem suspensos em lanternas de cultivo ao invés de enterrados em seu habitat natural, tal como se verificou no teste de resistência à anóxia. O fato desta tendência ter sido observada apenas no verão, indica que os fatores de estresse associados ao verão já mencionados

provavelmente estão atuando em sinergia com o estresse provocado pela manutenção dos berbigões em lanternas de cultivo. A tendência a valores levemente mais baixos encontrados na THC dos berbigões do grupo E2 em relação aos da REMAPI, também no verão, poderia ser o resultado de um aumento da infiltração de hemócitos nos diferentes tecidos desses berbigões, de sua morte por necrose celular, ou menor produção pelos tecidos hematopoiéticos.

Os HGs são considerados as células mais imunocompetentes da hemolinfa dos bivalves (BARACCO & DA SILVA, 2008) e, neste trabalho, optamos por apresentar apenas os resultados referentes a este tipo celular, uma vez que a porcentagem de hemócitos hialinos (HHs) é complementar à porcentagem dos HGs.

De modo semelhante, a contagem diferencial de hemócitos (DHC) também não revelou diferenças estatísticas na porcentagem de hemócitos granulares (HG) entre os grupos de animais dos diferentes pontos no inverno (R1= 63,2±3,3; R2= 61,6±3,5; E1= 64,2±2,8; E2= 64,1±3,0 e D= 69,7±2,5 % de HGs) (Fig. 8). Já no verão, período de maior estresse, foi observada uma diminuição significativa ($p<0,05$) de cerca de 5 % na porcentagem de HGs da hemolinfa dos animais do ponto E2 (73,0±1,8 %), em comparação aos animais provenientes de um dos pontos da Reserva (R1= 82,2±2,6 %). Apesar desta diferença não ter sido significativa no grupo E1 (74,4±1,8 %), os valores de HGs neste grupo foram muito mais próximos aos do grupo E2 do que à de qualquer outro grupo (Fig. 8).

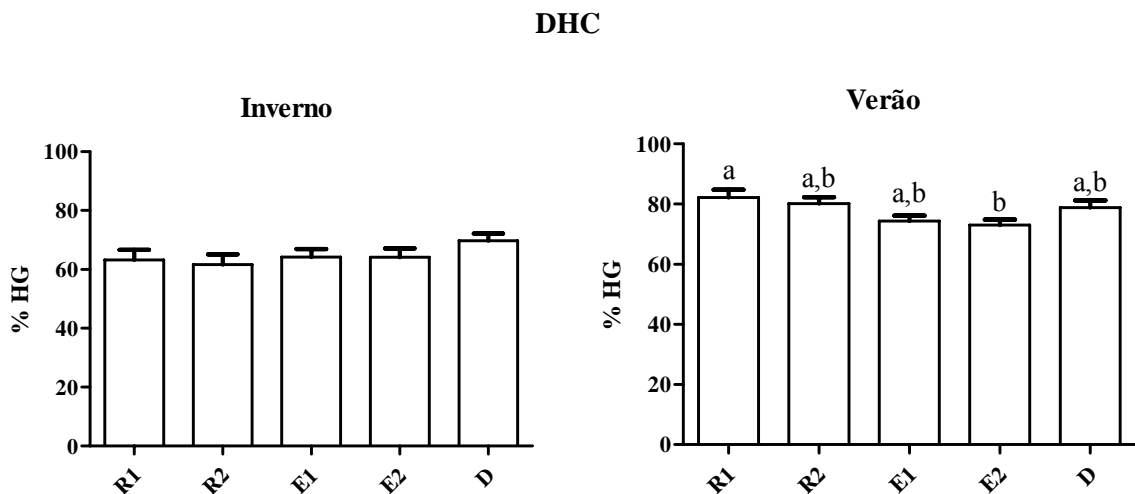


Figura 8. Porcentagem de hemócitos granulares (HG) dos diferentes grupos de berbigões coletados no inverno e no verão. As barras representam as porcentagens médias de 10 *pools* de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos ($p<0,05$).

A menor porcentagem de HGs nos berbigões do grupo E2 e a tendência a menores valores no grupo E1 no verão podem ser explicadas devido à liberação destes hemócitos contendo compostos

tóxicos para fora do seu corpo, através de seu tubo digestivo. Este fenômeno já foi observado em bivalves da espécie *Scrobicularia plana* na qual análises histoquímicas revelaram hemócitos contendo metais sendo liberados através da parede do tubo digestivo destes animais (CARGNIN-FERREIRA, 2005).

O fato dos berbigões dos grupos E1 e E2 possuírem uma menor porcentagem de HGs ou apenas uma tendência a tal indica que eles estão levemente deprimidos em relação aos animais provenientes da REMAPI, já que o HG é o tipo celular mais imunocompetente. A ocorrência de uma imunodepressão em relação aos animais da Reserva poderia acarretar uma maior susceptibilidade dos animais dos pontos impactados por efluentes domésticos a infecções por microorganismos oportunistas, como as bactérias do gênero *Vibrio*, que são particularmente abundantes na água durante o verão (vide revisão de MYDLARZ et al., 2006). Cabe ainda salientar que os animais do grupo E2 foram coletados no ponto de maior concentração de coliformes fecais no período. Uma vez que este grupo foi o único que apresentou diferenças significativas em relação aos animais provenientes da REMAPI, estes resultados sugerem que o nível de contaminação por efluentes domésticos pode estar correlacionado com o nível das células mais imunocompetentes ou HG. De fato, vários autores já demonstraram que a presença de diferentes tipos de poluentes pode induzir alterações na proporção dos tipos celulares na hemolinfa de bivalves (vide revisões de GALLOWAY & DEPLEDGE, 2001; MYDLARZ et al., 2006). Em mexilhões *Mytilus edulis* foi referida uma diminuição na porcentagem de HGs eosinófilos quando em presença de cobre, em experimentos realizados em laboratório (PIPE et al., 1999). Em contrapartida, em um estudo de campo realizado em locais contaminados por metais, incluindo cobre, em concentrações semelhantes ao do experimento anterior, esta mesma espécie de mexilhão não apresentou diferenças na proporção dos tipos hemocíticos (DYRYNDA et al., 1998). Os resultados aparentemente opostos nestes dois estudos é um exemplo das diferenças de resposta que podem ocorrer em estudos realizados em condições controladas de laboratório em relação aos estudos de campo.

Apesar de no inverno, os níveis de coliformes fecais estarem mais elevados do que no verão, nos pontos E1 e E2, não foi observado um declínio significativo da porcentagem de HGs nos animais destes locais como no verão. Estes resultados poderiam ser explicados pela ocorrência de fatores de estresse adicionais no verão, como já foi discutido anteriormente, para o teste de RA.

4.6 Determinação da porcentagem de apoptose (Ap)

A porcentagem de hemócitos apresentando sinais de apoptose, como por exemplo, lobulação do núcleo, mostrou-se muito baixa (menos de 1 %) em todos os grupos de berbigões tanto no inverno quanto do verão. A coloração de Hoechst permitiu ainda visualizar a ocorrência de micronúcleos que foi também muito baixa (menos que 1 %) e que foi somada à taxa de apoptose (Fig. 9) a fim de verificar alterações morfológicas no núcleo de forma geral.

Apesar de no inverno os berbigões dos grupos E1 e E2 apresentarem uma tendência a maiores porcentagens de Ap ($0,8\pm 0,4$ e $0,5\pm 0,2$ % respectivamente), no verão essa porcentagem foi menor e semelhante a um dos grupos da REMAPI (R1) ($E1=0,3\pm 0,1$; $E2=0,2\pm 0,2$; $R1=0,3\pm 0,2$ %). O grupo D foi o que apresentou a menor Ap no inverno ($0,1\pm 0,1$ %). Em contrapartida, no verão apresentou a maior porcentagem juntamente com o grupo R2 ($R2=0,9\pm 0,4$; $D=0,9\pm 0,4$).

A ocorrência de apoptose e presença micronúcleos em hemócitos ou outros tipos celulares de bivalves encontra-se frequentemente relacionada à presença de contaminação ambiental (WRISBERG et al., 1992; WRISBERG & VANDERGAAG, 1992; BURGEOT et al., 1995; RUSSO & MADEC, 2007). Contudo, os resultados não mostraram mais uma vez uma correlação clara entre a taxa de apoptose/micronúcleo e a contaminação ambiental por efluentes domésticos.

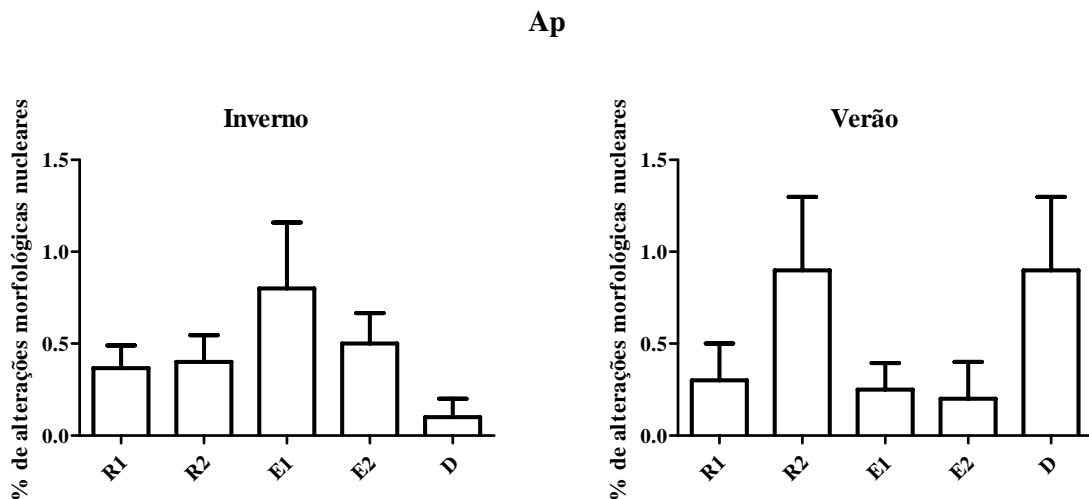


Figura 9. Porcentagem de hemócitos potencialmente apoptóticos e/ou com micronúcleo (Ap) nos diferentes grupos de berbigões coletados no inverno e no verão. As barras representam as médias \pm erro padrão de 10 *pools* de 6 animais em cada grupo.

4.7 Determinação do título aglutinante (lectinas) da hemolinfa (TA)

O TA dos berbigões contra eritrócitos de cão mostrou-se relativamente baixo (≤ 64) em relação ao dos outros bivalves, não havendo diferenças estatísticas entre os diferentes grupos tanto no inverno quanto no verão (Fig. 10). Houve, contudo uma tendência a menores valores no TA da hemolinfa dos animais do grupo D, no verão (TA = 4-8) (Fig. 10). Possíveis explicações sobre a tendência a valores diferenciados no grupo D em relação aos grupos da REMAPI já foram discutidas anteriormente.

Devido ao fato das lectinas serem consideradas PRPs, sua concentração na hemolinfa pode variar em animais infectados ou com saúde debilitada (BARRACCO & DA SILVA, 2008). No

entanto, não está claro se a capacidade de aglutinação da hemolinfa de bivalves pode ser modulada por poluentes, uma vez que existem muito poucos trabalhos a este respeito. Em um estudo realizado com mexilhões *Perna perna* expostos a diferentes concentrações de óleo diesel, os autores não encontraram diferenças significativas no TA dos animais expostos ou não a estes hidrocarbonetos (PIRES et al., 2003), assim como ocorreu em nosso estudo.

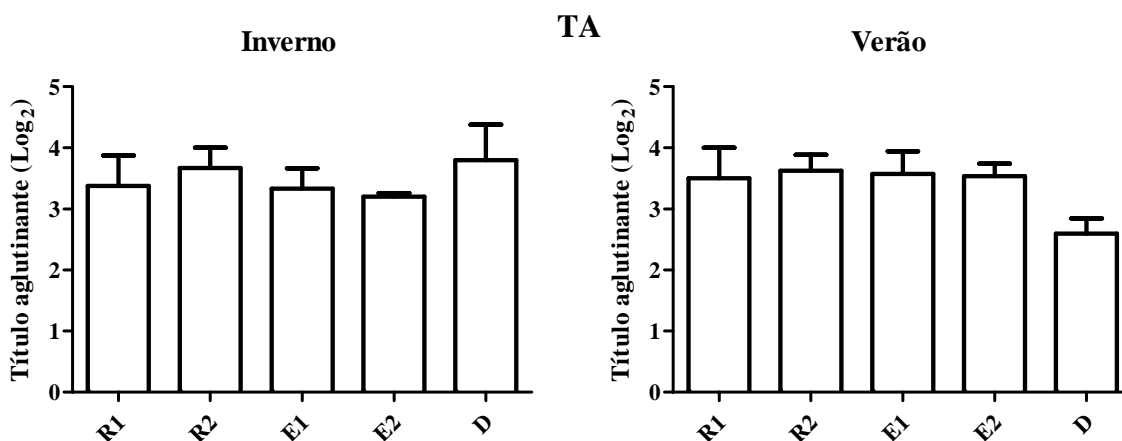


Figura 10. Título aglutinante (TA) da HT dos diferentes grupos de berbigões coletados no inverno e verão contra eritrócitos de cão. As barras representam as médias \pm erro padrão de 10 *pools* de 6 animais em cada grupo.

4.8 Concentração de proteínas totais na hemolinfa (CP)

A CP dos berbigões dos diferentes grupos não mostrou variações estatisticamente significativas no inverno (Fig. 11). Já no verão houve um aumento ($p < 0,05$) de cerca de 10 % na CP dos grupos E1 ($368 \pm 9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e E2 ($368 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação aos animais do grupo R1 ($R1 = 331 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$). (Fig. 11).

A concentração proteica (CP) da hemolinfa dos bivalves vem sendo utilizada como parâmetro de saúde (FISHER et al., 1996; BARTH et al., 2005; SCHLEDER et al., 2008), uma vez que a ativação dos hemócitos por patógenos (BARRACCO & DA SILVA, 2008) ou por outros fatores de estresse (AUFFRET et al., 2006) induz a liberação de proteínas imunofetoras para o plasma.

CP

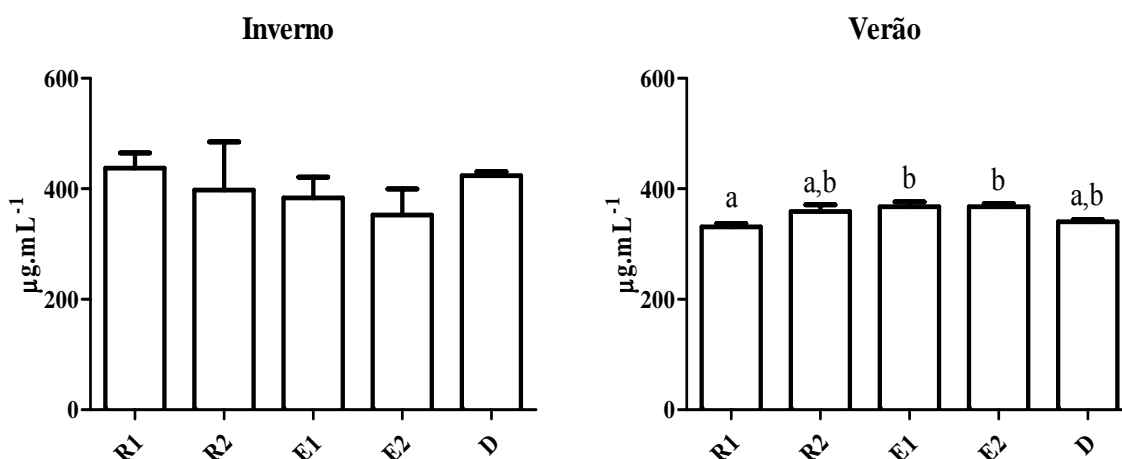


Figura 11. Concentração de proteínas totais (CP) na hemolinfa dos diferentes grupos de berbigões coletados no inverno e no verão. As barras representam as médias \pm erro padrão de 10 *pools* de 6 animais em cada grupo. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

É interessante notar que os grupos E1 e E2, que apresentaram uma CP significativamente mais elevada no verão mostraram tendência a valores mais baixos de THC e uma menor porcentagem de HGs neste mesmo período. Estes resultados sugerem que o aumento da CP poderia ser atribuído à lise de hemócitos com aumento de proteínas imunofetoras na hemolinfa. AUFFRET et al. (2006) registrou um aumento da CP de mexilhões *M. galloprovincialis* provenientes de locais contaminados do mar mediterrâneo e atribuiu este aumento a danos ocorridos nos tecidos (histólise) e/ou disfunções metabólicas induzidas pela contaminação.

Apesar de existirem relativamente poucos trabalhos relacionando a variação da CP de bivalves e poluentes, pode-se também citar os trabalhos de PICKWELL & STEINERT (1984) com mexilhões *M. edulis* expostos ao cobre e de ORDAS et al. (2007) com mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a um derramamento de petróleo nos quais houve um aumento da CP da hemolinfa.

4.9 Detecção da atividade da PO

Apesar do sistema pró-fenoloxidase (proPO) ser um parâmetro imunológico muito utilizado para avaliar estado de saúde de crustáceos e insetos, este processo é pouco conhecido em moluscos, principalmente no que se refere à sua participação no sistema imunológico destes animais (BARRACCO & DA SILVA, 2008). Este sistema vem sendo cada vez mais utilizado para avaliar a condição de saúde de bivalves em resposta à contaminação ambiental (PIPE et al., 1999; CHENG et al., 2004a; CHENG et al., 2004b; THIAGARAJAN et al., 2006; BADO-NILLES et al., 2008).

No entanto, no presente estudo, a atividade da PO na hemolinfa dos berbigões mostrou resultados inconsistentes e inconclusivos, tanto no inverno quanto no verão (dados não mostrados). A metodologia para avaliar este parâmetro deverá ser melhor padronizada na seqüência deste trabalho.

4.10 Produção intracelular de ânion superóxido pelos hemócitos

A produção intracelular de ânion superóxido (O_2^-) foi avaliada apenas no verão, período sabidamente de maior estresse para os animais e quantificada pela redução do NBT. Contudo, após indução com laminarina (β -1,3 glicanas), a produção de O_2^- não apresentou, mais uma vez, diferenças significativas entre os grupos estudados. Observou-se, contudo, que apenas os berbigões do grupo D não foram capazes de apresentar estimulação em resposta à laminarina, devido à uma tendência a valores basais mais elevados, quando comparado aos outros grupos (Fig. 12). A produção de ERO pelos hemócitos associada à fagocitose é uma das mais importantes reações imunológicas em bivalves (VARGAS-ALBORES & BARRACCO, 2001; DA SILVA & BARRACCO, 2008) e é um parâmetro muito utilizado para avaliar a imunocompetência dos moluscos.

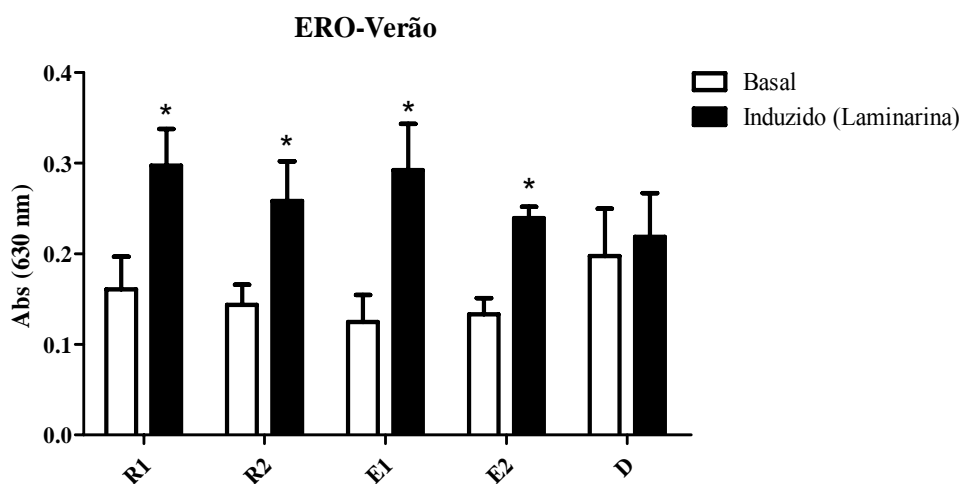


Figura 12. Produção intracelular de ânion superóxido (ERO), nos diferentes grupos de berbigões coletados no inverno e no verão. As barras representam as médias \pm erro padrão de 3 *pools* de 3 animais em cada grupo. * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a produção de ERO basal e induzida pela laminarina para cada grupo.

A impossibilidade de ativar os hemócitos com laminarina nos animais do grupo D, diferentemente dos outros grupos, sugere que os berbigões em processo de depuração estejam com o seu sistema imune já ativado e sem possibilidade de responder ao indutor. Estes resultados sugerem mais uma vez, que o transplante de berbigões de seu habitat sedimentar natural para lanternas suspensas de cultivo representa uma condição de estresse para estes animais.

No que diz respeito à utilização deste parâmetro em estudos de contaminação ambiental, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, já foram detectadas alterações na produção de ERO em hemócitos de mexilhões *M. galloprovincialis* provenientes de locais contaminados por efluentes domésticos e plataformas petroquímicas (AUFFRET et al., 2006), em hemócitos de ostras

expostos *in vitro* a poluentes orgânicos (ANDERSON et al., 1997) e hemócitos de mexilhões *P. viridis* após exposição em laboratório a concentrações subletais de cobre e mercúrio por 5 dias (THIAGARAJAN et al., 2006).

4.11 Avaliação das diferenças sazonais

Para melhor visualizar as diferenças sazonais, foi realizada uma avaliação de todos os imunoparâmetros, considerando em conjunto os dois grupos provenientes da REMAPI (R) e os dois grupos oriundos dos pontos impactados por efluentes domésticos (E), além do ponto D (Fig. 13). Os resultados mostraram diferenças sazonais na THC (Fig. 13-A) dos grupos R e E, os quais apresentaram valores muito inferiores no verão em relação ao inverno (redução média de cerca de 40 %) e na porcentagem de HGs em todos os grupos (Fig.13-B), sendo que no verão os animais apresentaram uma maior porcentagem (aumento médio de cerca de 16 %).

Como mencionado anteriormente, o verão é considerado o período de maior susceptibilidade dos moluscos bivalves, devido a diferentes fatores como o amadurecimento das gônadas, as altas temperaturas da água e a maior proliferação de microorganismos, alguns dos quais potencialmente patogênicos (THIELTGES, 2006; SAMAIN et al., 2007; TRAVERS et al., 2008).

A menor quantidade de hemócitos circulantes observada nos grupos da REMAPI e nos impactados por efluentes domésticos no verão pode ser explicada pelo maior gasto energético dos berbigões para o amadurecimento das gônadas, direcionando, assim, menos energia para a produção de hemócitos.

Os menores valores observados na THC na maioria dos grupos de berbigões no verão podem ser explicados também pela infiltração dos hemócitos nos tecidos destes animais a fim de combater possíveis infecções por organismos patogênicos que, como mencionado anteriormente, são particularmente mais abundantes no verão.

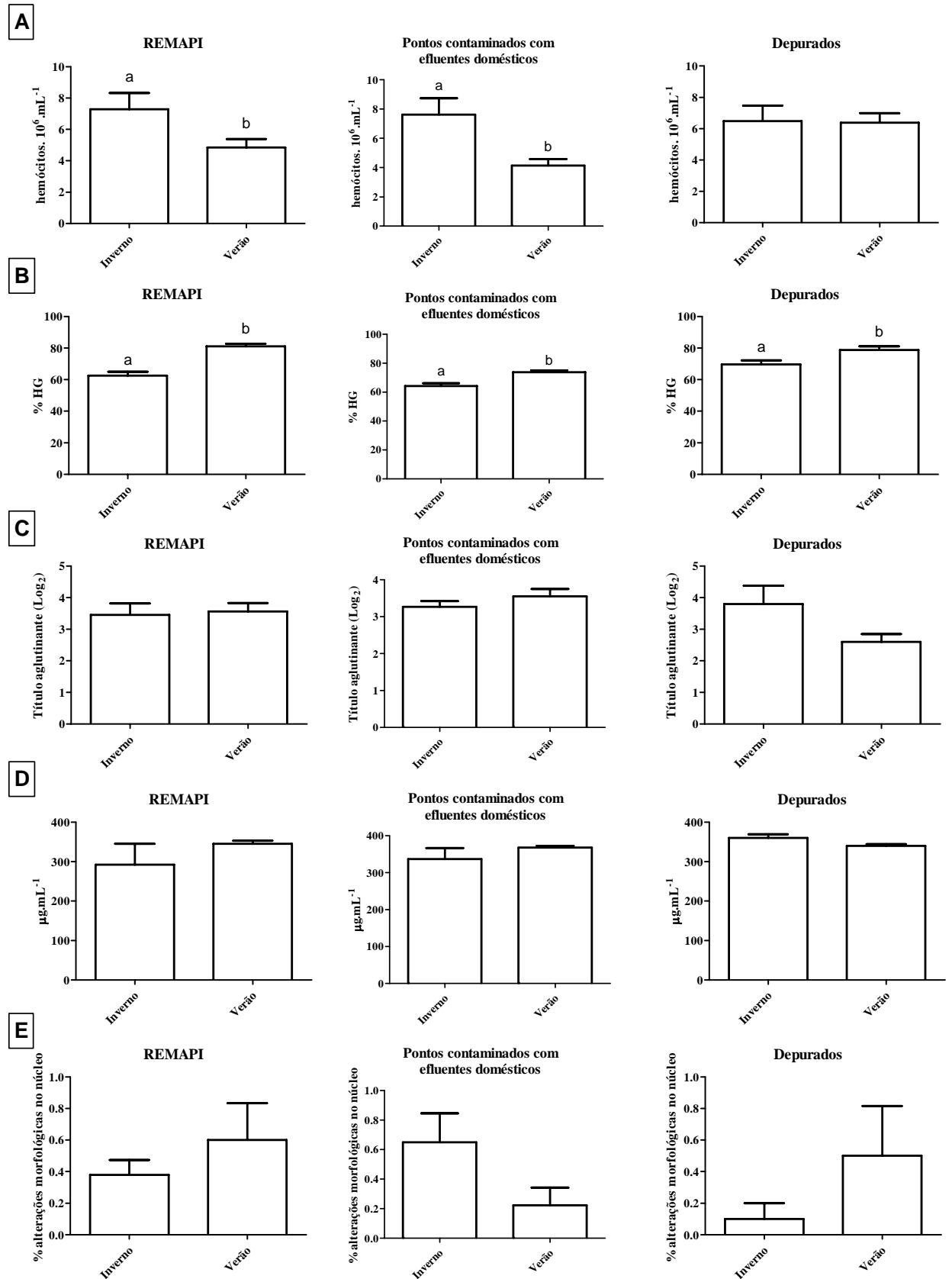


Figura 13. Análise sazonal dos diferentes imunoparâmetros analisados nos períodos do inverno e verão. (A) Contagem total de hemócitos (THC); (B) Contagem diferencial de hemócitos (DHC); (C) Título aglutinante (TA); (D) Concentração proteica total da hemolinfa (CP) e (E) Porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleo (Ap). REMAPI- média dos grupos R1 e R2; Pontos contaminados com efluentes domésticos- média dos grupos E1 e E2 para o inverno e o verão.

5. INTEGRAÇÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo levaram a algumas informações interessantes:

» Foi confirmado que os berbigões sofrem uma alteração de seu estado imunológico entre o inverno e verão, observada a partir das alterações no hemograma dos animais. Isto se deve provavelmente ao fato do verão constituir o período de maior estresse para moluscos bivalves.

» Foi observado, curiosamente, que o grupo D (berbigões submetidos à depuração) apresentou mais tendências a valores diferenciados nos parâmetros imunológicos analisados, do que todos os outros grupos (maior THC, menor TA, alta produção basal de anion superóxido). Além disso, também revelaram um estado fisiológico geral mais debilitado, evidenciado pela baixa RA dos animais pertencentes a esse grupo. Estes resultados decorrem provavelmente do estresse provocado pela manutenção destes animais em lanternas de cultivo suspensas, sendo que seu hábito natural é o de permanecerem enterrados no sedimento. Esta mudança de habitat durante a depuração acarreta, portanto, estresse aos berbigões e deve ser levada em consideração pelos pescadores/cultivadores. A permanência dos animais nesta condição por um tempo mais prolongado pode, por exemplo, facilitar infecções por microorganismos oportunistas presentes na água, o que não é desejável. Assim, recomenda-se que o processo de depuração não se prolongue (apenas alguns dias) para evitar um agravamento desse estresse.

» Foi confirmado que os pontos de coleta localizados na costa (E1 e E2), próximos à REMAPI, estavam de fato contaminados por efluentes domésticos tanto no inverno quanto no verão a partir das análises de coliformes fecais. Já os pontos da REAMPI (R1 e R2), situados a cerca de 2 km da costa, felizmente, ainda não estão contaminados. Cabe salientar, que o nível de coliformes fecais nos pontos da costa (E1 e E2) está muito superior ao permitido pela resolução CONAMA n°274/2000 (43 NMP/100 ml) tanto no inverno quanto no verão, o que caracteriza essas áreas como impróprias.

» A condição de saúde dos berbigões das regiões impactadas (E1 e E2), avaliada através de seus parâmetros hemato-imunológicos, mostrou-se surpreendentemente, pouco alterada. Apenas alguns poucos parâmetros apresentaram alteração, em especial no verão, como uma leve diminuição da principal célula imunocompetente ou HG (apenas o grupo E2) e maior concentração de proteínas plasmáticas (CP). Contudo, a maioria dos parâmetros analisados encontrava-se dentro do padrão de normalidade, sugerindo uma boa condição de saúde dos animais o que é ainda corroborado pelo seu alto índice de condição. Estas observações poderiam ser o resultado de uma *adaptação* dos animais neste ambiente *cronicamente* afetado por efluentes domésticos. Como provavelmente os animais já

vivem nesta condição, há um longo tempo, devem ter desenvolvido adaptações fisiológicas eficientes para sobreviver neste habitat alterado antropicamente. Cabe, contudo salientar, que a extração de berbigões para consumo humano nestes pontos é altamente desaconselhável, em vista da grande abundância de coliformes fecais, o que evidencia a alta contaminação por efluente doméstico e conseqüentemente, a provável presença de contaminantes nesses efluentes, cuja concentração pode ser ainda mais elevada na carne dos berbigões devido ao seu hábito filtrador.

» Frente à situação descrita no item anterior, pode-se concluir que os parâmetros hemato-imunológicos da espécie *A. brasiliensis* não se mostraram suficientemente sensíveis à contaminação crônica por efluentes domésticos. No entanto, deve ser levantada a questão se de fato a contaminação por efluentes domésticos nestes locais apresentava elevados níveis de contaminantes químicos, uma vez que efluentes domésticos apresentam grandes diferenças em sua composição que dependem diretamente do perfil das atividades da população da qual eles se originam. Ou seja, possivelmente não foram observadas alterações evidentes nos grupos E1 e E2, pois na verdade estes efluentes não apresentavam uma concentração e/ou composição desses contaminantes necessárias para afetar adversamente o sistema imune destes animais.

» Os resultados dos parâmetros analisados nos berbigões dos dois pontos da Reserva (R1 e R2) apresentaram algumas variações entre si, como no caso da RA, DHC e CP no verão. Estas diferenças se devem possivelmente à hidrodinâmica da baía onde se localiza a REMAPI e os pontos impactados (vide Fig.2), onde as correntes de água circulam no sentido anti-horário (E. J. SORIANO-SIERRA, comunicação pessoal). Isso significa que o ponto R2 recebe primeiro as águas provenientes dos pontos impactados por efluentes domésticos do que o ponto R1. Talvez, os resultados diferenciados obtidos nos animais provenientes do ponto R2 se devam ao fato dos contaminantes atingirem primeiro essa região, podendo afetar esses berbigões. Já a região R1 recebe estas águas posteriormente, havendo uma maior probabilidade de dispersão dos contaminantes.

» Apesar disso, felizmente, a Reserva ainda apresenta uma aparente boa qualidade ambiental, assim como os recursos pesqueiros ali extraídos, apesar de sua proximidade à zona de despejo de efluentes domésticos. No entanto, fica um alerta decisivo sobre o risco de contaminação deste importante ecossistema e seus recursos pesqueiros em vista da sua relativa proximidade à costa, com alta influência antropogênica e sem tratamento de efluentes. A Reserva sustenta muitas famílias de pescadores artesanais e praticamente todo o comércio de berbigão da Ilha de Santa Catarina. Logo, o interesse pela sua conservação não se restringe apenas a aspectos ecológicos, mas também à sua evidente importância socioeconômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. S.; BRUBACHER, L. L.; CALVO, L. M. R.; BURRESON, E. M. & UNGER, M. A. Effect of in vitro exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. **Environmental Research**. v.74, n.1, p.84-90. 1997.
- ANDRAL, B.; STANISIERE, J. Y.; SAUZADE, D.; DAMIER, E.; THEBAULT, H.; GALGANI, F. & BOISSERY, P. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. **Marine Pollution Bulletin**. v.49, n.9-10, p.704-712. 2004.
- AUFFRET, M.; ROUSSEAU, S.; BOUTET, I.; TANGUY, A.; BARON, J.; MORAGA, D. & DUCHEMIN, M. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.63, n.3, p.393-405. 2006.
- BADO-NILLES, A.; GAGNAIRE, B.; THOMAS-GUYON, H.; LE FLOCH, S. & RENAULT, T. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Toxicology in Vitro**. v.22, n.6, p.1610-1617. 2008.
- BARRACCO, M. A. & DA SILVA, P. M. Hemolinfa e Sistema Imune. In: **Mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações**. C. RESGALLA JR.; L. I. WEBER & M. B. DA CONCEIÇÃO (eds.) Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p. 85-102.
- BARRACCO, M. A. ; PERAZZOLO, L. M. & ROSA, R. D. . Immunología de crustáceos, con énfasis en camarones. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Org.). **Guía Práctica en Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. - Ed. Panamá: CYTED, 2008, v.1, p. 169-224.
- BARTH, T.; MORAES, N. & BARRACCO, M. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. **Aquatic Living Resources**. v.18, n.2, p.179-186. 2005.
- BODIN, N.; BURGEOT, T.; STANISIÈRE, J. Y.; BOCQUENÉ, G.; MENARD, D.; MINIER, C.; BOUTET, I.; AMAT, A.; CHEREL, Y. & BUDZINSKI, H. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v.138, n.4, p.411-427. 2004.
- BOEHS, G. & MAGALHÃES, A. R. M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região

continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.21, p.865-869. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.

BURGEOT, T.; HIS, E. & GALGANI, F. THE MICRONUCLEUS ASSAY IN CRASSOSTREA-GIGAS FOR THE DETECTION OF SEAWATER GENOTOXICITY. **Mutation Research-Genetic Toxicology**. v.342, n.3-4, p.125-140. 1995.

BUTT, D.; ALADAILEH, S.; O'CONNOR, W. A. & RAFTOS, D. A. Effect of starvation on biological factors related to immunological defence in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). **Aquaculture**. v.264, n.1-4, p.82-91. 2007.

CARGNIN-FERREIRA, E. Evaluación de la contaminación metálica sobre la población de *Scrobicularia plana* de las marismas del Caño Sancti-Petri (suroeste de la Península Ibérica). Universidad de Cádiz, Cádiz. 2005.

CERENIUS, L. & SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**. v.198, n.1, p.116-126. 2004.

CHEN, M. Y.; YANG, H. S.; DELAPORTE, M.; ZHAO, S. J. & XING, K. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.345, n.1, p.52-60. 2007.

CHENG, W.; HSIAO, I. S. & CHEN, J. C. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.17, n.3, p.193-202. 2004a.

CHENG, W. T.; HSIAO, I. S. & CHEN, J. C. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. **Diseases of Aquatic Organisms**. v.60, n.2, p.157-164. 2004b.

CHU, F. L. E. & LAPEYRE, J. F. EFFECT OF ENVIRONMENTAL-FACTORS AND PARASITISM ON HEMOLYMPH LYSOZYME AND PROTEIN OF AMERICAN OYSTERS (*CRASSOSTREA-VIRGINICA*). **Journal of Invertebrate Pathology**. v.54, n.2, p.224-232. 1989.

CICCOTELLI, M.; CRIPPA, S. & COLOMBO, A. Bioindicators for toxicity assesment of effluents from a wastewater treatment plant. **Chemosphere**. v.37, n.14-15, p.2823-2832. 1998.

- DE ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; GARCIA, C. C. M.; PRADO, F. M.; RONSEIN, G. E.; SIGOLO, C. A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A. M. G.; MEDEIROS, M. H. G. & DI MASCIO, P. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**. v.146, n.4, p.588-600. 2007.
- DE ZWAAN, A.; CORTESI, P. & CATTANI, O. Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. **Science of the Total Environment**. v.171, n.1-3, p.121-125. 1995.
- DYRYNDA, E. A.; PIPE, R. K.; BURT, G. R. & RATCLIFFE, N. A. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. **Aquatic Toxicology**. v.42, n.3, p.169-185. 1998.
- FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**. v.205, n.3, p.223-240. 2004.
- FISHER, W. S.; OLIVER, L. M. & EDWARDS, P. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. **Journal of Shellfish Research**. v.15, n.3, p.555-564. 1996.
- FORD, S. E. & HASKIN, H. H. INFECTION AND MORTALITY PATTERNS IN STRAINS OF OYSTERS *CRASSOSTREA-VIRGINICA* SELECTED FOR RESISTANCE TO THE PARASITE *HAPLOSPORIDIUM-NELSONI* (MSX). **Journal of Parasitology**. v.73, n.2, p.368-376. 1987.
- FORD, S. E. & PAILLARD, C. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.23, n.2, p.280-291. 2007.
- GAGNAIRE, B.; THOMAS-GUYON, H.; BURGEOT, T. & RENAULT, T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. **Cell Biology and Toxicology**. v.22, n.1, p.1-14. 2006.
- GALLOWAY, T. S. & DEPLEDGE, M. H. Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. **Ecotoxicology**. v.10, n.1, p.5-23. 2001.
- HEGARET, H.; SMOLO-WITZ, R. I.; WIKFORS, G. H.; DEFAVER, J.; WALTON, W.; MURPHY, D. & SHUMWAY, S. E. Effect of temperature on hemocyte responses of northern Quahogs (= hard clams, *Mercenaria mercenaria*) from different populations. **Journal of Shellfish Research**. v.27, n.4, p.1016-1016. 2008.

- HUMMEL, H.; MODDERMAN, R.; AMIARD-TRIQUET, C.; RAINGLET, F.; VAN DUIJN, Y.; HERSSEVOORT, M.; DE JONG, J.; BOGAARDS, R.; BACHELET, G.; DESPREZ, M.; MARCHAND, J.; SYLVAND, B.; AMIARD, J.-C.; RYBARCZYK, H. & DE WOLF, L. A comparative study on the relation between copper and condition in marine bivalves and the relation with copper in the sediment. **Aquatic Toxicology**. v.38, n.1-3, p.165-181. 1997.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé – SC**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/resex/pirajuba/visite.htm>>. Acesso em: 10 de agosto de 2009.
- LEVINTON, J. S. **Marine Biology – Function, Biodiversity, Ecology**. New York: Oxford University Press. 420p. 1995.
- LIAO, C.-M.; JOU, L.-J. & CHEN, B.-C. Risk-based approach to appraise valve closure in the clam *Corbicula fluminea* in response to waterborne metals. **Environmental Pollution**. v.135, n.1, p.41-52. 2005.
- MALAGOLI, D.; CASARINI, L.; SACCHI, S. & OTTAVIANI, E. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.23, n.1, p.171-177. 2007.
- MARQUES, M. R. F. & BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**. v.191, n.1-3, p.23-44. 2000.
- MONSERRAT, J. M.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M. G.; PINHO, G. L. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W. & PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.552, n.1-2, p.247-268. 2004.
- MOUEZA, M.; GROS, O. & FRENKIEL, L. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia, Veneridae). **Journal of Molluscan Studies**. v.65, p.73-88. 1999.
- MOUNEYRAC, C.; LINOT, S.; AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; MÉTAIS, I.; DUROU, C.; MINIER, C. & PELLERIN, J. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. **General and Comparative Endocrinology**. v.157, n.2, p.133-141. 2008.

- MYDLARZ, L. D.; JONES, L. E. & HARVELL, C. D. Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**. v.37, p.251-288. 2006.
- NASCIMENTO, I. A., PEREIRA, S. A. & LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como Instrumentos Preventivos de Poluição. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (eds.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa Editora. p.413-432. 2008.
- ORDAS, M. C.; ALBAIGES, J.; BAYONA, J. M.; ORDAS, A. & FIGUERAS, A. Assessment of in vivo effects of the prestige fuel oil spill on the Mediterranean mussel immune system. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.52, n.2, p.200-206. 2007.
- PARRY, H. E. & PIPE, R. K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). **Aquatic Toxicology**. v.69, n.4, p.311-325. 2004.
- PETROVIC, M.; GONZALEZ, S. & BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v.22, n.10, p.685-696. 2003.
- PICKWELL, G. V. & STEINERT, S. A. SERUM BIOCHEMICAL AND CELLULAR-RESPONSES TO EXPERIMENTAL CUPRIC ION CHALLENGE IN MUSSELS. **Marine Environmental Research**. v.14, n.1-4, p.245-265. 1984.
- PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Developmental & Comparative Immunology**. v.16, n.2-3, p.111-122. 1992.
- PIPE, R. K.; COLES, J. A.; CARISSAN, F. M. M. & RAMANATHAN, K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**. v.46, n.1, p.43-54. 1999.
- PIRES, K.; GARGIONI, R.; SANDRINI, J. Z. & BARRACCO, M. A. Evaluation of some haemato-immunological parameters in the Brown mussel *Perna perna* experimentally exposed to Diesel oil. In: VILLALBA, A.; REGUERA, B.; ROMALDE, J. & BEIRAS, R. (eds.). **Molluscan Shellfish Safety**. Xunta de Galicia, Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO, Santiago de Compostela, p.581-592. 2003.
- PRÓSPERI, V. A. & NASCIMENTO, I. A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (eds.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa Editora. p.413-432. 2008.

- RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. Ed. Rio Grande. 492p. 1994.
- RUSSO, J. & MADEC, L. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. **Cell and Tissue Research**. v.328, n.2, p.431-441. 2007.
- SAMAIN, J. F.; DEGREMONT, L.; SOLETSCHNIK, P.; HAURE, J.; BEDIER, E.; ROPERT, M.; MOAL, J.; HUVET, A.; BACCA, H.; VAN WORMHOUDT, A.; DELAPORTE, M.; COSTIL, K.; POUVREAU, S.; LAMBERT, C.; BOULO, V.; SOUDANT, P.; NICOLAS, J. L.; LE ROUX, F.; RENAULT, T.; GAGNAIRE, B.; GERET, F.; BOUTET, I.; BURGEOT, T. & BOUDRY, P. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. **Aquaculture**. v.268, p.227-243. 2007.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Alguns aspectos ecológicos e análise da população de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo, USP**. Tese (Doutoramento). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 119 p. 1976.
- SCHLEDER, D. D.; KAYSER, M.; SUHNEL, S.; FERREIRA, J. F.; RUPP, G. S. & BARRACCO, M. A. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**. v.280, n.1-4, p.256-263. 2008.
- SÖDERHÄLL, K. & HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v.797, n.1, p.99-104. 1984.
- TERAHARA, K. & TAKAHASHI, K. G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. **Current Pharmaceutical Design**. v.14, n.2, p.131-137. 2008.
- TERZIC, S.; SENTA, I.; AHEL, M.; GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELO, D.; MULLER, J.; KNEPPER, T.; MARTI, I.; VENTURA, F.; JOVANCIC, P. & JABUCAR, D. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. **Science of the Total Environment**. v.399, n.1-3, p.66-77. 2008.
- THIAGARAJAN, R.; GOPALAKRISHNAN, S. & THILAGAM, H. Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.51, n.3, p.392-399. 2006.
- THIELTGES, D. W. Parasite induced summer mortality in the cockle *Cerastoderma edule* by the trematode *Gymnophallus choledochus*. **Hydrobiologia**. v.559, n.1, p.455-461. 2006.

- TRAN, D.; FOURNIER, E.; DURRIEU, G. & MASSABUAU, J.-C. Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. **Aquatic Toxicology**. v.66, n.3, p.333-343. 2004.
- TRAVERS, M. A.; LE GOIC, N.; HUCHETTE, S.; KOKEN, M. & PAILLARD, C. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. **Fish & Shellfish Immunology**. v.25, n.6, p.800-808. 2008.
- VARGAS-ALBORES, F. & BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. (ed.) **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura**. La Paz: Limusa. p.127-140. 2001.
- VELDHUIZENTSOERKAN, M. B.; HOLWERDA, D. A. & ZANDEE, D. I. ANOXIC SURVIVAL-TIME AND METABOLIC PARAMETERS AS STRESS INDEXES IN SEA MUSSELS EXPOSED TO CADMIUM OR POLYCHLORINATED-BIPHENYLS. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.20, n.2, p.259-265. 1991.
- VENTURA-LIMA, J. & BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**. v.146, n.1-2, p.221-234. 2007.
- WANG, W. X.; WIDDOWS, J. & PAGE, D. S. EFFECTS OF ORGANIC TOXICANTS ON THE ANOXIC ENERGY-METABOLISM OF THE MUSSEL MYTILUS-EDULIS. Elsevier Sci Ltd, v.34, p.327-331.
- WOOTTON, E. C.; DYRYNDA, E. A.; PIPE, R. K. & RATCLIFFE, N. A. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. **Aquatic Toxicology**. v.65, n.1, p.13-25. 2003.
- WRISBERG, M. N.; BILBO, C. M. & SPLIID, H. Induction of Micronuclei in Hemocytes of *Mytilus-Edulis* and Statistical-Analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.23, n.2, p.191-205. 1992.
- WRISBERG, M. N. & VANDERGAAG, M. A. In vivo Detection of Genotoxicity in Waste-Water from a Wheat and Rye Straw Paper Pulp Factory. **Science of the Total Environment**. v.121, p.95-108. 1992.
- ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (eds.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa Editora. p.1-13. 2008.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J. & JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**. v.606, n.2, p.135-150. 2008.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; CHIABRANDO, C.; GRASSI, P. & FANELLI, R. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. **Water Research**. v.42, n.4-5, p.961-968. 2008.