



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS NA VIEIRA *Nodipecten nodosus* EM
DIFERENTES ETAPAS DO CICLO REPRODUTIVO E SUBMETIDA A UMA DIETA
RICA EM CAROTENÓIDES

DELANO DIAS SCHLEDER

FLORIANÓPOLIS

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS NA VIEIRA *Nodipecten nodosus* EM
DIFERENTES ETAPAS DO CICLO REPRODUTIVO E SUBMETIDA A UMA DIETA
RICA EM CAROTENÓIDES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Orientadora: Dra Margherita Anna Barracco

DELANO DIAS SCHLEDER

FLORIANÓPOLIS

2007

Biólogo Schleder, Delano Dias,

Parâmetros hemato-imunológicos na vieira *Nodipecten nodosus* em diferentes etapas do ciclo reprodutivo e submetida a uma dieta rica em carotenóides-2007, 55 f. tabs., grafs.

Orientador: Margherita Anna Barracco

Dissertação de Mestrado em Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

1. *Nodipecten nodosus*, 2. parâmetros hemato-imunológicos, 3. astaxantina, 4. bivalves, 5. estresse reprodutivo.

**Parâmetros hemato-imunológicos na vieira *Nodipecten nodosus*
em diferentes etapas do ciclo reprodutivo e submetida
a uma dita rica em carotenóides**

Por

DELANO DIAS SCHLEDER

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco - *Orientadora*

Dr. Jaime Fernando Ferreira

Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

AGRADECIMENTOS

A professora Margherita Anna Barracco pela orientação, dedicação e paciência durante a realização do mestrado, e principalmente por todo conhecimento a mim transmitido;

Ao professor Rogério Gargioni pela ajuda e paciência na realização das coletas de hemolinfa e na manutenção dos aquários;

Ao professor Jaime Fernando Ferreira e à amiga Simone Sühnel por todo trabalho e empenho que tornou possível a realização do presente trabalho;

Ao pesquisador Guilherme Rupp pela presteza na disponibilização dos animais para a realização dos experimentos;

Aos funcionários e bolsistas do Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC pela prestatividade e competência;

Aos professores Artur Smânia Junior e Elza Smânia por disponibilizarem espaço e aparelhos de seu laboratório;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura, Mirian Kayser, Rafael da Rosa, professora Luciane Perazzolo, Paula Bandeira, Sara Löfgren, Cristiane Guertler, Andrezza Costa, Priscila Gonçalves, Mariana Borsa e Daniele Mello que tanto me auxiliaram;

Aos amigos Felipe do Nascimento Vieira, Celso Buglioni e Ricardo Bittencourt pelo apoio e amizade;

A todos os amigos do mestrado pelo companheirismo e amizade;

Aos meus familiares por toda dedicação e carinho;

Aos meus pais Daltro Schleder e Eloty Justina Dias Schleder, meu irmão Jeferson Dias Schleder e minha irmã Maristel Dias Schleder por todo amor, confiança e apoio demonstrado em todos os momentos da minha vida;

A Deus pela vida e por tornar realidade todos meus sonhos e aspirações;

Em fim, a todos que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
Alguns aspectos relacionados ao cultivo de moluscos bivalves	13
Aspectos gerais da família Pectinidae	14
Sistema imune dos moluscos	15
Células da hemolinfa ou hemócitos	16
Fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	16
Peptídeos antimicrobianos (PAM)	17
Proteínas de reconhecimento: Lectinas	18
Sistema pró-fenoloxidase (proPO)	19
Hemogramas	19
Imunoestimulantes – Astaxantina	20
Objetivo	21
Formatação do Artigo	21
1. Introdução	25
2. Material e métodos	27
2.1. Material biológico	27
2.2. Delineamento Experimental	28
2.3. Coleta de hemolinfa	28
2.4. Caracterização dos hemócitos	29
2.4.1 Microscopia de contraste de fase (MCF)	29
2.4.2 Coloração Giemsa	29
2.4.3 Detecção de mitilina e defensina por imunofluorescência indireta (IF)	29
2.5. Hemogramas	30
2.5.1 Contagem total de hemócitos (Total haemocyte count - THC)	30
2.5.2 Contagem diferencial de hemócitos (Differential hemocyte count - DHC)	30
2.6. Detecção e caracterização de aglutininas/lectinas da hemolinfa	30
2.7. Detecção da atividade da fenoloxidase (PO)	31
2.8. Fagocitose e produção de ânion superóxido	31
2.9. Atividade antimicrobiana	32
2.10. Determinação da concentração total de proteínas (CP)	32
2.11. Análise estatística	32
3. Resultados	32
3.1. Caracterização dos hemócitos	33
3.2. Hemogramas	35
3.2.1 Contagem total de hemócitos - THC (Total haemocyte count)	35
3.2.2 Contagem diferencial de hemócitos- DHC (Differential haemocyte count)	35
3.3. Determinação da concentração de proteínas totais (CP)	36
3.4. Determinação da atividade aglutinante do plasma, cálcio dependência e especificidade por açúcares	37
3.5. Detecção da atividade da fenoloxidase (PO)	39
3.6. Fagocitose e produção de ERO (ânions superóxido) pelos hemócitos	40
3.7. Atividade antimicrobiana	41
4. Discussão	41
5. Conclusão	46
6. Referências	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade hemaglutinante do plasma de adultos de *N. nodosus* contra diferentes eritrócitos de vertebrados, cálcio dependência e especificidade por açúcares. _____ 38

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Valva esquerda e direita de um indivíduo adulto da espécie *Nodipecten nodosus*. _____ 15

Artigo científico

- Fig. 1. Hemócitos da hemolinfa de *Nodipecten nodosus* observados ao microscópio de contraste de fase (A-C), coloração Giemsa (D-I) e imunofluorescência indireta (J-M), (A) Hemócito hialino (HH), (B) Hemócito granular (HG) com núcleo riniforme, (C) HG com núcleo circular, (D, E e F) hemócitos hialinos, (G). HG com grânulos basófilos e núcleo riniforme, (H) HG com grânulos eosinófilos e núcleo esféricos, (I) HG com núcleo lobado ; (J) hemócito, controle negativo, (L) hemócito positivo para mitilina e (M) hemócito positivo para defensina. A barra corresponde a 10 μm . _____ 34
- Fig. 2. Contagem total de hemócitos dos diferentes grupos de vieiras. As barras representam a média \pm desvio padrão de 12 indivíduos em cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. _____ 35
- Fig. 3. Porcentagem de hemócitos granulares (HG) e hialinos (HH) nos diferentes grupos de vieira. As barras representam a porcentagem média de 6 animais de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. _____ 36
- Fig. 4. Concentração de proteínas totais do plasma (PL) e hemolinfa total (HT) dos diferentes grupos de vieiras. As barras representam a média \pm desvio padrão dos 3 pools de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. _____ 37
- Fig. 5. Título aglutinante do plasma (PL) dos diferentes grupos de vieiras contra eritrócitos de cão. As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 pools de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. _____ 39
- Fig. 6. Atividade da enzima PO ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$) na hemolinfa total dos diferentes grupos de vieiras em pH 7,6 e 9,0. As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 pools de animais de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. _____ 40
- Fig. 7. Produção basal de ERO, e induzida por zymosan, pelos hemócitos de *N. nodosus* dos diferentes grupos de animais. As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 pools de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. _____ 41

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

μg – Micrograma

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlet

A – Grupo dos adultos não maduros

ANOVA – Análise de variância

BGBP – β -1,3-glucan binding protein, proteínas de reconhecimento de β -1,3 – glucanos

BSA – *Bovine serum albumin*, albumina de soro bovino

BSM – *Bovine submaxillary mucin*, mucina submaxilar bovina

Ca^{2+} – íon cálcio

CaCl_2 – Cloreto de cálcio

CP – Concentração de proteínas

D – Grupo de adultos desovados e alimentados com dieta padrão

Da – Grupo de adultos desovados e alimentados com dieta suplementada com astaxantina

DHC – *Differential haemocytes count* – contagem diferencial de hemócitos

DNA – *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucléico

$\text{DO}_{630 \text{ nm}}$ – Densidade óptica a 630 nm

DP – Desvio padrão da média

EDTA – *Ethylene diamine tetracetic acid*, ácido diamino tetracético

EGTA – *Ethylene glycol tetracetic acid*, ácido tetracético etileno glicol

EP – Erro padrão da média

ERO – Espécies reativas de oxigênio

G – Gauge

g - Grama

g – Gravidade

GalNAc – N-acetil-galactosamina

GlcNAc – N-acetil-glicosamina

h – Hora

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HG – Hemócitos granulares

HH – Hemócitos hialinos

HT – Hemolinfa total

IF – Imunofluorescência

J – Grupo de juvenis

kDa – Quilodaltons

L – Litro

LB – Luria Bertani

L-DOPA – L-dihidroxifenilalanina

log – Logarítmo de base 10

\log_2 – Logarítmo de base 2

LPS – Lipopolissacarídeos

M – Grupo de adultos maduros e alimentados com dieta padrão

m – Metro

M – Molar
Ma – Grupo de adultos maduros e alimentados com dieta suplementada com astaxantina
MAS – *Modified Alsever solution*, solução de Alsever modificada
MCF – Microscopia de contraste de fase
mg – Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – Minuto
mL – Mililitro
mM – Milimolar
n – Número amostral
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT – *Nitroblue tetrazolium*
nm – Nanômetro
O₂⁻ – Ânion superóxido
°C – Graus Celsius
OH⁻ – Radical hidroxil
ONOO⁻ – Peroxinitrito
p – Nível de probabilidade
PAM – Peptídeos antimicrobianos
PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns*, padrões moleculares associados à patógenos
PB – *Poor broth*, caldo simples
PBS – *Phosphate buffer solution*, tampão fosfato salino
PG – Peptidoglicanos
pH – Potencial hidrogeniônico
PL – Plasma
PO – Fenoloxidase
ppm – Partes por milhão
proPO – Pró-fenoloxidase
PRPs – *Pattern recognition proteins*, proteínas de reconhecimento de padrão
PWS – *Peptonated water saline*, água salina peptonada
SOD – Superóxido dismutase
TBS-1 – *Tris buffer solution*, tampão de Tris salino 1
TBS-2 – *Tris buffer solution*, tampão de Tris salino 2
TBS-3 – *Tris buffer solution*, tampão de Tris salino 3
TCBS – Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sucrose
THC – *Total haemocytos count* - contagem total de hemócitos
U – Unidade internacional de atividade enzimática
UV – Raio ultravioleta

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo básico do sistema imune da vieira *Nodipecten nodosus* e avaliar a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos ao longo de seu ciclo reprodutivo e em relação a uma dieta rica no carotenóide astaxantina, como um suplemento anti-estresse. As vieiras foram agrupadas em: juvenis (J), adultos (A), sexualmente maduros (M) e recém desovados (D). Os dois últimos grupos foram também tratados com uma dieta rica em astaxantina (Ma e Da). Vários parâmetros hemato-imunológicos foram selecionados para avaliação dos diferentes grupos: hemogramas, produção de espécies reativas de oxigênio, atividades aglutinante, antimicrobiana e da enzima fenoloxidase (PO) e concentração de proteínas totais. Além do mais, foram caracterizados os hemócitos circulantes das vieiras, encontrando-se hemócitos hialinos e granulares, sendo estes últimos ricos em peptídeos antimicrobianos (defensinas e mitilinas). A atividade aglutinante do plasma também foi caracterizada e esta, mostrou-se específica para galactose e sialo-conjugados e parcialmente dependente de cálcio. De modo geral, os vários parâmetros avaliados mostraram um comportamento semelhante ao longo do ciclo reprodutivo das vieiras, havendo um amadurecimento do sistema imune dos juvenis (J) para adultos (A), e uma acentuada depleção deste sistema por ocasião da maturação gonádica (M), que tendeu a se recuperar após a desova (D). A dieta rica em astaxantina influenciou as reações imuno-oxidativas, reduzindo parcialmente o estresse reprodutivo sofrido pelas vieiras (Ma e Da).

Palavras chaves: 1. *Nodipecten nodosus*, 2. parâmetros hemato-imunológicos, 3. astaxantina, 4. estresse reprodutivo, 5. imunoestimulantes, 6. bivalves.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to basically characterize the immune system of the scallop *Nodipecten nodosus* and to evaluate some hemato-immunological parameters along its reproductive cycle and in relation to a diet rich on the carotenoid astaxanthin, as an anti-stress supplement. Scallops were organized in different groups: juveniles (J), adults (A), sexually mature (M), and recently spawned animals (S). The two last groups were also treated with a diet rich on astaxanthin (Ma and Sa). Several hemato-immunological parameters were selected to evaluate in the different scallop groups: hemograms, reactive oxygen species production, agglutinating, antimicrobial and phenoloxidase (PO) activities and total protein concentration. In addition, we also characterized the scallop circulating hemocytes: hyaline cells and granular cells and the latter were rich in antimicrobial peptides (defensins and mytilins). The plasma agglutinating activity was also characterized and was shown to be specific to galactose and sialoconjugates and was partially calcium-dependent. In general terms, all hemato-immunological parameters had a similar profile along the scallop reproductive cycle. Their levels increased significantly from juveniles to adults, and then declined markedly (immune depletion) in the sexually mature scallops. After spawning, the animals had a tendency to recover their immune competency. The diet rich on astaxanthin partially reduced the scallop reproductive stress by partially decreasing the immune-oxidative reactions (M and Ma).

Key words: 1. *Nodipecten nodosus*, 2. hemato-immunological parameters, 3. astaxanthin, 4. reproductive stress, 5 immunostimulants, 6. bivalves.

INTRODUÇÃO

Alguns aspectos relacionados ao cultivo de moluscos bivalves

A aquicultura mundial tem se expandido enormemente nestes últimos anos, ganhando um grande destaque no setor de produção animal. Esta atividade teve um crescimento médio de 6% ao ano no período de 2000 a 2004, enquanto que a produção de carne apresentou um crescimento médio de apenas 1,8%. Em 2000, a produção aquícola foi de 45,7 milhões de toneladas (US\$ 56,7 bilhões) e, em 2004, passou para 59,4 milhões de toneladas (US\$ 70,3 bilhões), sendo o grupo dos moluscos responsável por 22,5% dessa produção, atrás apenas dos peixes de água doce (40,5%) (BORGHETTI *et al.*, 2003; FAO, 2004).

Em 2004, a malacocultura mundial totalizou uma produção de 13,3 milhões de toneladas, gerando uma receita de 9,8 bilhões de dólares americanos, sendo o continente asiático o grande responsável por esta produção, respondendo por 90% do total produzido, seguido da Europa com 5,8%, da América do Norte com 2% e, por fim, da América do Sul, Oceania e África com apenas 2,2% da produção total (FAO, 2004).

Dentre os moluscos cultivados, as ostras representam cerca de 40% da produção mundial, seguidas dos mexilhões (15%), vieiras (10%) e outros bivalves (35%). Entretanto, as vieiras tendem a ganhar espaço na malacocultura mundial nos próximos anos, devido a sua intensa pesca predatória, grande disponibilidade de áreas para seu cultivo e, principalmente, ao seu elevado valor comercial (BORGHETTI *et al.*, 2003; RUPP e BEM, 2003; FAO, 2004).

O cultivo de pectinídeos ou pectinicultura é uma indústria relativamente recente, iniciada pelo Japão na década de 70. Nos anos 80, o sucesso dessa indústria despertou o interesse de outros países e, atualmente, cerca de 15 países vêm realizando a pectinicultura. A China se destaca com a maior produção mundial, sendo que em 2004, produziu aproximadamente 1 milhão de toneladas (US\$ 1,1 bilhão). Nesse país, são cultivadas as espécies *Patinopecten yessoensis*, *Chlamys ferrerii*, *C. nobilis*, e, principalmente, *Argopecten irradians* (espécie exótica importada dos EUA). O Japão é o segundo maior produtor mundial, com uma produção de 215 mil toneladas (US\$ 323 milhões) de *Patinopecten yessoensis* neste mesmo ano, seguido do Chile, que produziu 24 mil toneladas (US\$ 239 milhões) de *Argopecten purpuratus*. A produção conjunta dos demais países em 2004 não superou mil toneladas, sendo *Pecten maximus* a principal espécie cultivada na Europa e *Placopecten magellanicus* no Canadá (FAO, 2004; RUPP e PARSONS, 2006).

No Brasil, a vieira *Nodipecten nodosus* tem sido cotada como uma espécie promissora para aquicultura, pois apresenta excelentes características para cultivo, como crescimento rápido, boa aceitação no mercado e alto valor comercial (MANZONI e RUPP, 1993; RUPP e BEM, 2003). No entanto, seu cultivo ainda está em fase experimental. O início das pesquisas se deu em 1990 em Santa Catarina com projetos desenvolvidos pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e, atualmente, três outras instituições estão envolvidas com o cultivo desta espécie, a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), a Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária (EPAGRI) em Santa Catarina e o Instituto de Eco-desenvolvimento da Baía de Ilha Grande (IEDBIG) no Rio de Janeiro. As pesquisas têm sido

enfocadas nos principais pontos críticos do seu cultivo, que, assim como o de outros pectinídeos, é a obtenção de larvas e sementes (moluscos jovens) de maneira sustentável para os produtores (RUPP e BEM, 2003; RUPP e PARSONS, 2006).

Segundo Nicolas e colaboradores (1996) a mortalidade de larvas está principalmente associada à presença de bactérias. As instalações das larviculturas são normalmente propensas à proliferação de bactérias, devido aos cultivos de microalgas, presença de matéria orgânica e temperatura constante. Um método bastante eficaz para controlar a proliferação de bactérias em larviculturas é a utilização de antibióticos (AVENDAÑO e RIQUELME, 1999; BEM, 1999). Todavia, a utilização indiscriminada de antibióticos vem causando um aumento progressivo de resistência bacteriana, além de problemas ambientais devido a liberação destes compostos para o ambiente. Portanto, métodos profiláticos alternativos têm sido propostos para o controle de enfermidades na larvicultura, como por exemplo a utilização de bactérias probióticas, limpeza dos equipamentos com produtos naturais, entre outros.

Outra alternativa para melhorar a qualidade larval em forma direta é através de uma nutrição diferenciada dos reprodutores, o que pode levar a uma maior resistência das larvas. Neste contexto, o trabalho de Racotta e colaboradores (1998) mostrou uma maior capacidade de maturação e de desova dos reprodutores de *Argopecten ventricosus* quando nutridos de forma otimizada, com alimentação contínua. Por outro lado, vários outros trabalhos têm focado o efeito benéfico de suplementos alimentares sobre o crescimento e desenvolvimento de moluscos bivalves (DELAUNAY *et al.*, 1993; CAERS, *et al.*, 1999; SOUDANT, *et al.*, 1999; SOUDANT, *et al.*, 2000; URIARTE *et al.*, 2004).

Aspectos gerais da família Pectinidae

Dentre os moluscos bivalves, o grupo dos pectinídeos se destaca por ser constituído de um grande número de espécies, apresentar uma ampla distribuição geográfica, ocupando uma vasta gama de habitats, e por serem importantes membros de uma variedade de comunidades bentônicas. São animais extremamente proeminentes e atrativos, com muitas espécies de importância comercial, sendo que sua carne é considerada uma iguaria em muitos países. Por essas várias razões, este grupo tem sido alvo de intensa pesquisa científica (BRAND, 2006).

A família Pectinidae possui 400 espécies viventes, conhecidas comumente como “vieiras”, “scallops” (inglês) ou “coquilles” (francês). Elas ocorrem em todos os oceanos do mundo desde os pólos até os trópicos. A maioria das espécies comercialmente importantes ocorre em águas próximas à costa na plataforma continental, mas podem ser encontradas também em águas de todas as profundidades desde a zona intertidal até cerca de 7.000 m de profundidade (BRAND, 2006).

No litoral brasileiro, a família Pectinidae está representada por 6 gêneros e 16 espécies. Dentre estas, destacam-se: *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (= *Lyropecten nodosus*), *Pecten ziczac* (Linnaeus, 1758) e *Clamys tehuelchus* (d'Orbigny, 1846) (RIOS, 1994). A espécie *N. nodosus* é também conhecida popularmente como “vieira”, “vieira pata de leão” ou em alguns locais como “coquille” e é o maior pectinídeo registrado no litoral brasileiro (RUPP e PARSONS, 2006). A sua

distribuição geográfica estende-se desde as ilhas do Caribe na América Central até Santa Catarina (Brasil) (RUPP e PARSONS, 2006).

Os dados batimétricos desta espécie são escassos. Rupp e Parsons (2006) relataram a ocorrência de exemplares de *N. nodosus* em águas costeiras rasas, entre 6 e 30 m. Esta espécie é sensível a variações ambientais, encontrando-se sob o substrato arenoso e de algas calcárias (RIOS, 1994; SILINA, 1996), não possuindo hábito gregário (SMITH, 1991).

N. nodosus é um pectinídeo caracterizado por possuir uma concha grande, sólida e convexa, com aurículas desiguais, e as costelas da valva esquerda apresentam nódulos. Sua coloração externa varia entre o amarelo, alaranjado e roxo-amarronzado (PEÑA, 2002). Trata-se de um bivalve hermafrodita simultâneo, onde a porção masculina da gônada amadurece antes da feminina (FREITAS, 2001). Apresenta desovas ao longo de todo ano, sendo as épocas de maior intensidade de liberação de gametas, na primavera e verão (MANZONI, 1994). Segundo evidências histológicas observadas por Freitas (2001), os indivíduos acima de 50 mm de comprimento atingem o estágio de maturidade sexual, passando da fase juvenil para adulta.

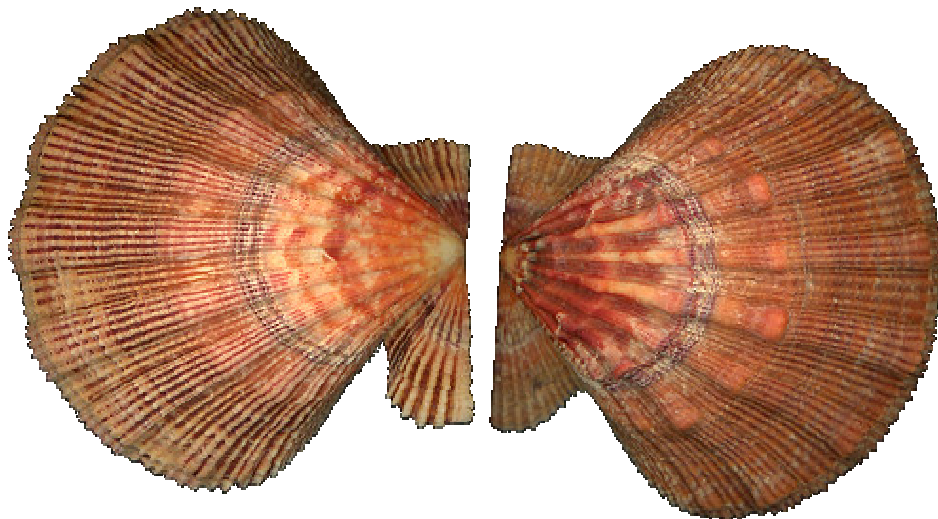


Figura 1: Valva esquerda e direita de um indivíduo adulto da espécie *Nodipecten nodosus*.

Sistema imune dos moluscos

Os moluscos, como todos os invertebrados, dispõem de um sistema imunológico que os protege contra patógenos. Este sistema restringe-se a uma imunidade inata, não ocorrendo o sistema adaptativo altamente específico dos vertebrados, que inclui a imensa variedade de anticorpos e receptores específicos e as células de memória.

De forma semelhante a outros invertebrados, o sistema imune dos moluscos está essencialmente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa. Este sistema engloba reações celulares, desempenhadas pelas células circulantes ou hemócitos, e reações humorais, onde atuam proteínas e outras moléculas dissolvidas no plasma. As respostas celulares compreendem especialmente a

fagocitose de microrganismos e o encapsulamento de parasitas de grande tamanho, cuja fagocitose pelos hemócitos não seria possível (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001). O encapsulamento assemelha-se a uma reação inflamatória clássica, onde os hemócitos infiltram-se nos tecidos infectados e segregam os parasitas em cápsulas multicelulares. Estes parasitas são posteriormente neutralizados ou destruídos pela produção de moléculas tóxicas e microbicidas a partir dos hemócitos circundantes (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001). Já os fatores humorais abrangem uma variedade de proteínas de reconhecimento, capazes de reconhecer 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 (ENGELMANN *et al.*, 2005; MUTA, 2006). Células e fatores humorais atuam de forma integrada na prevenção e controle de infecções nos moluscos, garantindo sua integridade corpórea e sobrevivência.

Células da hemolinfa ou hemócitos

Relata-se comumente a ocorrência de dois grupos básicos de hemócitos em bivalves; os que são ricos em grânulos, denominados *hemócitos granulares* ou *granulócitos* (HG), e os com pouco ou nenhum grânulo, conhecidos como *hemócitos hialinos* ou *agranulócitos* (HH) (HINE, 1999; VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001).

No que se refere aos pectinídeos, existe uma controvérsia quanto à presença dos hemócitos granulares. Foi referido que, em *Chlamys varia* e *Pecten maximus*, não se encontravam HG na hemolinfa (AUFFRET, 1988; HENRY *et al.*, 1990; MORTENSEN e GLETTE, 1996). No entanto, há relatos recentes da presença de HG em *Chlamys farreri* (XING *et al.*, 2002; XING e ZHAN, 2005), *Argopecten irradians* (LIU *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006), e *Argopecten purpuratus* (GONZALEZ e ARENAS, 2002). Zhang e colaboradores (2006) identificaram 4 tipos de hemócitos em *A. irradians* por microscopia eletrônica e de luz, e os denominaram de hialinócitos pequenos (tipo I), hialinócitos grandes (tipo II), granulócitos pequenos (tipo III) e granulócitos grandes (tipo IV). No que se refere a *Nodipecten nodosus*, um relato preliminar descreveu apenas a presença de HH na hemolinfa desta espécie (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001).

Os HG parecem ser, de modo geral, as células mais ativas nas respostas imunológicas de moluscos. Embora sua composição e função possam variar grandemente entre os bivalves, estas células são capazes de fagocitar ativamente microrganismos, produzir enzimas digestivas, gerar espécies reativas de oxigênio, produzir proteínas de reconhecimento como as lectinas e sintetizar diferentes tipos de proteínas e peptídeos antimicrobianos (HINE, 1999; VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001). Neste contexto, a ausência de HG em alguns pectinídeos de importância comercial poderia estar relacionada a uma maior susceptibilidade destes bivalves a infecções e às mortalidades elevadas freqüentemente observadas no cultivo destas espécies.

Fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A fagocitose representa a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos. Neste processo, os agentes estranhos são englobados, internalizados e destruídos imediatamente após o

contato com hemócitos. A degradação do agente estranho no fagossomo se dá por uma gama de mecanismos microbicidas, os quais podem incluir a liberação de enzimas hidrolíticas e oxidativas (PIPE, 1990; RENWRANTZ *et al.*, 1996), a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (PIPE, 1992; ARUMUGAM *et al.*, 2000) e de peptídeos antimicrobianos (PAM) (MITTA *et al.*, 2000a).

As ERO são agentes microbicidas potentes produzidos por um mecanismo conhecido por choque respiratório ou estresse oxidativo, onde há um consumo aumentado de oxigênio pelos hemócitos. O primeiro composto a ser formado é o ânion superóxido (O_2^-) através da redução do oxigênio molecular pela ativação da enzima NADPH oxidase, associada às membranas celulares. Este composto dá origem, direta ou indiretamente, as outras ERO tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^-) e oxigênio singlet (1O_2). O radical O_2^- também pode reagir com óxido nítrico produzindo o peroxinitrito ($ONOO^-$), composto extremamente tóxico capaz de produzir danos severos nas membranas, proteínas e DNA. Em conjunto, estes radicais possuem um papel importante na destruição de microrganismos invasores, podendo porém danificar também o tecido do hospedeiro. Para neutralizar os efeitos não desejados, existem enzimas antioxidantes como: a glutatona-redutase, a catalase e a superóxido dismutase (SOD). Ademais, vários compostos exógenos de baixo peso molecular tais como a glutatona, carotenóides e as vitaminas C e E também possuem ação antioxidante (*scavengers*), sendo capazes de minimizar os danos causados pelas ERO aos tecidos do hospedeiro (ANDERSON, 1996; ROCH, 1999; VARGAS-ALBORES e BARRACO, 2001). A imuno-modulação da produção de ERO já foi evidenciada em vários moluscos bivalves sob condições de estresse, como aqueles expostos a metais pesados, derivados de petróleo, agrotóxicos, e infecções por diferentes patógenos (VOLETY e CHU, 1995; ANDERSON, 1996; WOOTTON *et al.*, 2003). Em pectinídeos, Lambert e Nicolas (1998) relataram que a produção de ERO foi suprimida quando os hemócitos eram incubados com bactérias do gênero *Vibrio*. Camus e colaboradores (2002) evidenciaram um aumento na produção de ERO e uma concomitante depleção das defesas antioxidantes de *Chlamys islandicus*, quando este pectinídeo era exposto ao benzopireno. Hégaret e Wikfors (2005) também observaram o incremento das ERO em *Argopecten irradians* expostos a um *bloom* do dinoflagelado *Prorocentrum minimum*.

Peptídeos antimicrobianos (PAM)

Um dos componentes celulares de moluscos que vem despertando um crescente interesse, refere-se aos peptídeos antimicrobianos (PAM). Esses peptídeos foram inicialmente descritos e isolados da hemolinfa de insetos (STEINER *et al.*, 1981). A partir destas primeiras observações, vários trabalhos se sucederam, relatando a detecção, purificação e atividade antimicrobiana de vários tipos de PAM, na maioria dos seres vivos, incluindo moluscos (BULET *et al.*, 2004; TINCU e TAYLOR, 2004). Os PAM podem apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos, funcionando como fatores de defesa de baixa especificidade e raramente sendo tóxicos para células eucarióticas, o que lhes conferem um enorme potencial na utilização como antibióticos (HANCOCK *et al.*, 2006).

Em moluscos bivalves, os PAM foram identificados inicialmente na hemolinfa dos mexilhões *Mytilus edulis* (CHARLET *et al.*, 1996) e *M. galloprovincialis* (HUBERT *et al.*, 1996; MITTA *et al.*,

2000). Em *M. galloprovincialis*, por exemplo, foram identificadas quatro classes de PAM, com diferentes isoformas: defensinas, mitilinas, miticinas e mitimicinas (MITTA *et al.*, 2000a). As defensinas atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto as mitilinas (vária isoformas) apresentam um maior espectro de atividade, incluindo também bactérias Gram-negativas, como as do gênero *Vibrio*, e atuam de forma distinta, dependendo da isoforma. Os PAM de *M. galloprovincialis* são sintetizados de forma constitutiva principalmente nos hemócitos e são armazenados em grandes quantidades nos grânulos destas células. Durante infecções, os hemócitos migram para os sítios da infecção, fagocitam os microrganismos, destruindo-os intracelularmente através da ação combinada das enzimas lisossomais, mecanismos oxidativos e dos PAM (MITTA *et al.*, 2000).

No que se refere aos pectinídeos, a clamisina foi o primeiro relato de PAM. Trata-se de um peptídeo antimicrobiano de cerca de 11 kDa isolado das vísceras de *Chlamys inslandica* e capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas (NILSEN *et al.*, 1999).

Proteínas de reconhecimento: Lectinas

Como anteriormente mencionado, as reações humorais são mediadas por proteínas e outras moléculas da hemolinfa, que atuam sinergisticamente com as reações celulares, otimizando a resposta imune. Dentre as proteínas humorais, destacam-se as lectinas, que constituem um grupo de proteínas ou glicoproteínas de ocorrência natural no plasma dos bivalves, com capacidade de se ligar a açúcares específicos presentes na superfície de diferentes células, causando sua aglutinação. Esta reação ocorre devido ao fato das lectinas possuírem pelo menos dois sítios de ligação com os carboidratos específicos das células alvos (MARQUES e BARRACCO, 2000). As lectinas funcionariam como proteínas de reconhecimento de padrões moleculares específicos (PRP) de carboidratos presentes na superfície de patógenos (PAMPs), dando início às respostas imunes efetoras, como a aglutinação dos microrganismos invasores e/ou a fagocitose facilitada destes patógenos, atuando como opsoninas (MARQUES e BARRACCO, 2000). No que se refere as lectinas, a ocorrência destas moléculas na hemolinfa de bivalves foi descrita por diferentes autores (YAKOVLEVA *et al.*, 2001). Em bivalves, foi extensamente relatada a ocorrência de lectinas cálcio-dependentes (ODO *et al.*, 1995; TUNKIJJANUKIJ *et al.*, 1997; BULGACOV *et al.*, 2004; MINAMIKAWA *et al.*, 2004). Ademais, foi evidenciado que estas moléculas podem apresentar afinidade por uma vasta gama de carboidratos, sendo, porém, mais comumente específicas para açúcares N-acetil aminados, como o ácido N-acetil-neuramínico (NANA), N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina (SUZUKI e MORI, 1990; TUNKIJJANUKIJ *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2000; BULGACOV *et al.*, 2004).

Em pectinídeos, Wang e colaboradores (2007) detectaram e clonaram muito recentemente uma lectina presente no plasma de *Chlamys farreri*. Após sua expressão em sistema recombinante, os autores mostraram que se tratava de uma lectina cálcio-dependente (lectina tipo C) com atividade aglutinante contra a bactéria *E.coli*. Por outro lado, esta lectina não apresentou atividade contra eritrócitos de coelho, rato, camundongo, galinha e humanos. A lectina de *C. farreri* é produzida de forma constitutiva nos hemócitos, brânquias, gônadas e manto, mas é também induzida por *M. luteus*

e *V. anguillarum* nestes mesmos tecidos. Ademais, esta C-lectina foi capaz de inibir o crescimento de *M. luteus* e *E.coli*.

Sistema pró-fenoloxidase (proPO)

Outro importante mecanismo de defesa dos invertebrados é o sistema pró-fenoloxidase (proPO). Este sistema é ativado por uma série de eventos cuidadosamente regulados, nos quais polissacarídeos presentes na superfície de microrganismos iniciam uma cascata proteolítica que culmina na clivagem da enzima pró-fenoloxidase (forma inativa) em fenoloxidase (PO – forma ativa). A PO é a enzima responsável pelas reações de melanização, que acompanham usualmente os processos de encapsulamento e cicatrização de ferimentos em crustáceos e moluscos. A biossíntese da melanina é um processo complexo, que se inicia com a oxidação de compostos fenólicos (dihidroxifenilalanina/L-DOPA e difenóis) por ação da enzima PO, produzindo intermediários tóxicos como as quinonas e ERO (principais agentes imuno-efetores responsáveis pelo controle das infecções), os quais continuam se transformando por uma via não enzimática até a formação da melanina. Esta, por sua vez, é responsável por criar uma barreira física em torno do agente invasor, deste modo prevenindo ou retardando seu crescimento, e conferindo, normalmente, uma coloração escura ao tecido afetado (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001; CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004).

O conhecimento detalhado sobre o sistema proPO e seu papel na imunidade de invertebrados foram extensivamente estudados em artrópodes, notavelmente, em insetos e crustáceos (CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004). Entretanto, para moluscos existem apenas alguns relatos sobre a ocorrência deste sistema, sua ativação e envolvimento no sistema imune (COLES e PIPE, 1994; ASOKAN *et al.*, 1997; ASOKAN *et al.*, 1998; MERCADO *et al.*, 2002).

No caso de pectinídeos, trabalhos realizados com *Placopecten magellanicus* e *Argopecten irradians* mostraram que o sistema proPO destas espécies não é ativado por açúcares da superfície de microrganismos (DEATON *et al.*, 1999). Contrariamente, Luna-González e colaboradores (2003) reportaram que em *Argopecten ventricosus* e *Nodipecten subnodosus* o sistema proPO é ativado por componentes da parede de fungos.

Hemogramas

Os hemogramas, representados pela contagem total (THC – *total haemocytes count*) e diferencial de hemócitos (DHC – *differential haemocytes count*) funcionam como um dos imunoparâmetros mais amplamente utilizado para expressar as condições de saúde de bivalves (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001), apesar das amplas variações comumente observadas, tanto entre indivíduos quanto entre espécies de bivalves. Bower e colaboradores (1998) trabalhando com grupos de *Patinopecten yessoensis* de diferentes localidades e infectados pelo protozoário *Perkinsus qugwadi*, mostraram que alguns grupos apresentaram um maior número de hemócitos, enquanto outros, mesmo infectados, não sofriram alteração na quantidade destas células. Já em *Argopecten irradians* expostos ao dinoflagelado *Prorocentrum minimum*, foi observado um aumento bastante consistente na THC (HEGARET e WIKFORS, 2005).

Imunoestimulantes – Astaxantina

Dentre os compostos que têm mostrado propriedades imunoestimulantes destacam-se os carotenóides. Estes têm sido relatados como os principais pigmentos em muitos animais aquáticos (MEYERS, 1994). São compostos lipossolúveis, que além de terem sua atividade como pró-vitamina A, são requeridos também para o desenvolvimento gonádico, maturação, fertilização, eclosão, viabilidade larvária, percepção olfatória e quimio-recepção, foto-proteção e atividade antioxidante, além da transferência de Ca^{2+} através da membrana em moluscos bivalves (FARÍAS-MOLINA, 2001)

O grupo dos carotenóides consiste de mais de 600 pigmentos (CHEW, 1996), e, inserido neste grupo, encontra-se a astaxantina (3,3'-dihidroxi-caroteno-4,4'-diona) um carotenóide natural, predominante em muitas espécies de peixes marinhos e invertebrados (BJERKENG *et al.*, 1992; STOREBAKKEN e NO, 1992).

Os moluscos bivalves não são capazes de sintetizar astaxantina, e a sua obtenção é feita através da ingestão de organismos que sintetizam este pigmento (JOHNSON e SCHROEDER, 1995). A principal fonte de carotenóides para os animais aquáticos é o fitoplâncton, portanto espera-se que os bivalves filtradores não tenham limitações destes pigmentos quando alimentados com dietas microalgais (FARÍAS-MOLINA, 2001).

A astaxantina é também um dos pigmentos responsáveis pela cor da carne e gônada de muitos animais marinhos (GU *et al.*, 1997). Recentemente, foi demonstrado que a astaxantina purificada da microalga de *Haematococcus pluvialis*, é um potente agente antioxidante *in vitro* sob condições hidrofóbicas e hidrofílicas (KOBAYASHI e SAKAMOTO, 1999). Este pigmento apresenta uma maior atividade antioxidante comparativamente aos α -caroteno, β -caroteno, luteína, licopeno, canthaxantina e vitamina E (NAGUIB, 2000; RENGEL *et al.*, 2000).

O efeito imune-estimulante dos carotenóides já foi evidenciado em mamíferos (DEMING e ERDMAN, 1999; CHEW e PARK, 2004). Em peixes, Amar e colaboradores (2004) demonstraram que uma dieta suplementada com carotenóides, ou seja, com algas *Dunaliella salina* e *Phaffia rhodozyma* ricas em astaxantina, levou a modulação de alguns parâmetros do sistema imune inato da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Em invertebrados, também foi descrito o efeito imunoestimulante de diferentes carotenóides, como no ouriço-do-mar, *Pseudocentrotus depressus*, em estágio reprodutivo (KAWAKAMI *et al.*, 1998). Além do mais, foi observado um aumento na sobrevivência de náuplios de *Litopenaeus vannamei* alimentados com uma dieta enriquecida em astaxantina (CUZON *et al.*, 2004). Fu e colaboradores (2006) demonstraram que a suplementação com doses moderadas de vitamina A incrementavam as defesas antioxidantes no músculo e vísceras do abalone *Haliotis discus*.

O sistema imunológico de *N. nodosus* é ainda completamente desconhecido, apesar de seu grande potencial para aquicultura. Como comentado acima, o cultivo desta espécie no Brasil vem esbarrando em alguns pontos críticos cruciais para o sucesso desta atividade. Neste contexto, o estudo do sistema imune de *Nodipecten nodosus* poderia proporcionar importantes subsídios para compreender os mecanismos de resistência e susceptibilidade destes animais a infecções, e assim, auxiliar na prevenção e controle de enfermidades. Ademais, tendo em vista que o principal ponto crítico do cultivo deste pectínideo é a obtenção de larvas e sementes viáveis, e que tem sido evidenciado em outros grupos de animais, uma modulação do sistema imune pelos carotenóides,

uma alternativa interessante e inédita, seria de avaliar o efeito de uma dieta suplementada com carotenóides (astaxantina) sobre o sistema imunológico de reprodutores de *N. nodosus*, a fim de verificar se há uma redução do estresse causado pela maturação/desova e um conseqüente incremento na sobrevivência das larvas produzidas.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo básico do sistema imune do pectinídeo *Nodipecten nodosus* ao longo do ciclo reprodutivo e avaliar a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos a condições de estresse, como a desova, em presença de uma dieta rica em astaxantina.

Objetivos específicos:

- Identificar e caracterizar os hemócitos através de microscopia de luz;
- Detectar a presença dos peptídeos antimicrobianos (mitilinas e defensinas) nos hemócitos por imunofluorescência indireta;
- Determinar os hemogramas (contagem total e diferencial de hemócitos);
- Identificar e caracterizar as lectinas presentes no plasma e determinar sua atividade aglutinante contra diferentes eritrócitos;
- Detectar e quantificar a atividade da enzima fenoloxidase (PO) na hemolinfa;
- Estimar a concentração de proteínas totais da hemolinfa;
- Determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos hemócitos.

Formatação do Artigo

O artigo formatado de acordo com as normas da revista *Aquaculture*.

PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS NA VIEIRA *Nodipecten nodosus* EM
DIFERENTES ETAPAS DO CICLO REPRODUTIVO E SUBMETIDA A UMA DIETA
RICA EM CAROTENÓIDES

Delano D. Schleder^a, Mirian Kayser^a, Simone Sühnel^b, Jaime F. Ferreira^b,
Margherita A. Barracco^{a*}

^a Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 88.040-900, Brasil

^b Laboratório de Moluscos Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 88062-601, Brasil

(*) As correspondências devem ser endereçadas para:

e-mail: barracco@mbox1.ufsc.br

Fone: 55 48 3331.8951

Fax: 55 48 3331.5148

Resumo

O cultivo da vieira *Nodipecten nodosus* tem sido limitado pela baixa sobrevivência observada durante a larvicultura e pela fragilidade dos reprodutores às condições de cultivo. O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo básico do sistema imune desta vieira e avaliar a modulação de alguns parâmetros hemato-imunológicos ao longo de seu ciclo reprodutivo em relação a uma dieta rica no carotenóide astaxantina, como preventivo para o estresse reprodutivo. As vieiras foram sistematizadas em vários grupos: juvenis (J), adultos (A), adultos sexualmente maduros, prontos para a desova (M) e recém desovados (D). Os dois últimos grupos foram também tratados com uma dieta rica em astaxantina como imuno-estimulante (grupos Ma e Da). A hemolinfa da vieira apresentou dois tipos celulares em circulação, hemócitos hialinos (HH) e hemócitos granulares (HG) e estas células mostraram-se capazes de fagocitar e produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) mediante estimulação com zymosan (método de redução do NBT). Os HG mostraram conter peptídeos antimicrobianos semelhantes a defensinas e mitilinas de mexilhões, embora a hemolinfa da vieira não tenha apresentado atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, negativas, incluindo vibrios marinhos. O número de hemócitos circulantes, estimado em câmara de Neubauer, foi de 18 a 26 milhões.mL⁻¹ sendo os HG as células mais abundantes (67-99%). A atividade aglutinante do plasma contra diferentes tipos de eritrócitos de vertebrados foi baixa (título ≤ 32) relativamente à referida em outros bivalves. As lectinas do plasma de *N. nodosus* mostraram-se específicas para galactose e sialoconjugados, e foram apenas parcialmente cálcio-dependentes, o que difere das lectinas usualmente descritas em bivalves. A atividade da enzima fenoloxidase (PO) da hemolinfa das vieiras (145-446 U.min⁻¹.mg⁻¹) não foi induzida por tripsina e componentes da superfície de microrganismos, como ocorre em artrópodes, e o melhor ativador enzimático foi o pH alcalino (pH 9,0). A concentração de proteínas totais do plasma variou de 0,24 a 0,66 mg.mL⁻¹. De um modo geral, todos os parâmetros hemato-imunológicos de *N. nodosus* mostraram um perfil de variação semelhante, ao longo do ciclo reprodutivo, havendo um amadurecimento do sistema imunológico dos juvenis para os adultos e, em seguida, ocorrendo uma depleção significativa dos diferentes parâmetros por ocasião da maturação gonádica. Após desova, houve uma tendência de recuperação dos níveis hemato-imunológicos. A dieta rica no antioxidante astaxantina influenciou as reações imuno-oxidativas (produção de ERO e atividade da PO), reduzindo o estresse reprodutivo sofrido pelas vieiras e podendo, assim, contribuir para uma melhoria do desempenho reprodutivo das vieiras.

Palavras chaves: *Nodipecten nodosus*, parâmetros hemato-imunológicos, carotenóides, estresse reprodutivo, imunoestimulantes, bivalves.

Abstract

The cultivation of the scallop *Nodipecten nodosus* has been limited by the low larval survival and the fragility of the brood stocks under the present culture conditions. The main purpose of this study was to basically characterize the immune system of the scallop *N. nodosus* and evaluate the modulation of some hemato-immunological parameters along its reproductive cycle and in relation to a diet rich on the carotenoid astaxanthin, as a preventive supplement to minimize the reproduction stress. Scallops were: organized in different groups: juveniles (J), adults (A), sexually mature (M), and recently spawned (S) animals. The two last groups were also treated with a diet rich on astaxanthin (Ma and Sa) as immunostimulant. Two hemocyte types were found circulating in the scallop hemolymph, through light microscopy: hyaline hemocytes (HH) and granular hemocytes (GH). These hemocytes were capable to phagocytose and produce reactive oxygen intermediates (ROI) upon stimulation with zymosan (NBT reduction). The GH contained antimicrobial peptides similar to mussel defensins and mytilins (immunodetection). However, the scallop hemolymph did not show an antimicrobial activity against Gram positive and negative bacteria, including marine vibrios. The number of circulating hemocytes (Neubauer chamber) varied from 18 to 26 millions.mL⁻¹ and, and HG was the predominant cell (67-99%). The lectins of the plasma of *N. nodosus* were specific to galactose and sialoconjugates and were partially calcium-dependent. The phenoloxidase (PO) activity of the scallop hemolymph (145-446 U.min⁻¹.mg⁻¹) was not induced by trypsin and components of microorganism surface, as usually found in arthropods, and the best enzyme activator was the alkaline pH (≥ 8.5). The protein concentration of the plasma varied from 0.24 to 0.66 mg.mL⁻¹. In general terms, all hemato-immunological parameters had a similar profile along the scallop reproductive cycle. Their levels increased significantly from juveniles to adults, and then declined markedly (immune depletion) in the sexually mature scallops. After spawning, the animals showed a tendency to recover the levels of their hemato-immunological parameters. The diet rich on astaxanthin influenced only the immune-oxidative reactions (ROI production and PO activity), partially reducing the stress caused by scallop reproduction, and thus contributing to an improvement of the reproductive performance of this species.

Key words: *Nodipecten nodosus*, hemato-immunological parameters, cartenoids, reproductive stress, immunostimulants, bivalves.

1. Introdução

O cultivo de pectinídeos ou pectinicultura é uma indústria relativamente recente e vem ganhando grande destaque na Aqüicultura mundial. As vieiras estão entre os 10 (dez) produtos aquícolas mais cultivados no mundo, sendo a China o maior produtor com cerca de 80% do total produzido (FAO, 2004; Rupp e Parsons, 2006). No Brasil, a espécie *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) tem sido cotada como uma espécie promissora para aqüicultura, pois apresenta excelentes características para cultivo, como rápido crescimento, boa aceitação no mercado e alto valor comercial. Entretanto, o cultivo de *N. nodosus* apresenta alguns pontos críticos limitantes, como a obtenção de larvas e sementes viáveis (Manzoni e Rupp, 1993; Rupp e Bem, 2003; Rupp e Parsons, 2006).

A espécie *N. nodosus* conhecida é o maior pectinídeo registrado no litoral brasileiro e sua distribuição geográfica estende-se desde as ilhas do Caribe na América Central até Santa Catarina (Brasil) (Rupp e Parsons, 2006). É uma espécie hermafrodita simultânea, que apresenta desovas ao longo de todo ano, sendo as épocas de maior intensidade de liberação de gametas, na primavera e verão, e o início do seu estágio de maturidade sexual se dá em indivíduos acima de 50 mm de comprimento (Manzoni, 1994; Freitas, 2001).

Para o êxito das atividades de cultivo e manejo pesqueiro dos pectinídeos é fundamental que exista um bom conhecimento sobre a biologia das espécies envolvidas. Para tanto, o estudo do sistema imune dos pectinídeos poderia proporcionar importantes subsídios para compreender os mecanismos de resistência e susceptibilidade destes animais a infecções e auxiliar, assim, na prevenção e controle de enfermidades. Ademais, o acompanhamento de diferentes parâmetros imunológicos em vieiras cultivadas permite o monitoramento das condições de saúde dos animais durante seu ciclo de vida, possibilitando a intervenção precoce nos momentos críticos, como nos estresses fisiológicos e ambientais, ou no surgimento de infecções.

Os pectinídeos, como os demais moluscos e invertebrados, dispõem de um sistema imune inato, que está principalmente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa. Este sistema engloba reações celulares, desempenhadas pelas células circulantes ou hemócitos, e reações humorais, onde atuam proteínas e outras moléculas plasmáticas. As respostas celulares compreendem basicamente a fagocitose de microrganismos e o encapsulamento de parasitas pelos hemócitos, e sua posterior destruição por diferentes mecanismos microbicidas e degradativos (Vargas-Albores e Barracco, 2001). Já os fatores humorais incluem proteínas de reconhecimento, capazes de reconhecer 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 imunofetoras que levam a neutralização ou destruição dos patógenos invasores (Engelmann et al., 2005; Muta, 2006). Células e fatores humorais atuam de forma integrada na prevenção e controle de infecções, garantindo a integridade corpórea e sobrevivência dos moluscos.

Um dos principais e mais potentes mecanismos microbicidas que ocorre durante o processo fagocítico é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Neste processo, conhecido como choque respiratório ocorre um consumo aumentado de oxigênio molecular pela enzima de membrana

dos hemócitos, NADPH oxidase, que se ativa em presença de compostos da superfície de microrganismos e gera uma cascata de radicais de oxigênio altamente tóxicos, iniciada pela produção do ânion superóxido (Anderson, 1996; Vargas-Albores e Barracco, 2001). Em pectinídeos, este processo já foi referido. Lambert e Nicolas (1998) relataram que a produção de ERO pelos hemócitos de *Pecten maximus* foi suprimida quando incubados com bactérias do gênero *Vibrio*. Hégaret e Wikfors (2005) observaram o incremento das ERO em *Argopecten irradians* expostos a um bloom do dinoflagelado *Prorocentrum minimum*.

Além da produção de ERO, os hemócitos de moluscos bivalves produzem ainda peptídeos e proteínas antimicrobianas (PAM) capazes de neutralizar rapidamente um amplo espectro de microrganismos, funcionando como fatores de defesa de baixa especificidade e raramente sendo tóxico para células eucarióticas, o que lhes conferem um enorme potencial de utilização como antibióticos (Hancock et al., 2006). Em moluscos bivalves, os PAM foram identificados inicialmente na hemolinfa dos mexilhões *Mytilus edulis* (Charlet et al., 1996) e *M. galloprovincialis* (Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999a,b; 2000a,b). Dentre os PAM encontrados nestes bivalves, destacam-se as defensas e mitilinas, pelo seu potente e amplo espectro de ação (Mitta et al., 2000b Tincu e Taylor, 2004). As defensas atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto as mitilinas apresentam um maior espectro de atividade, incluindo também bactérias Gram-negativas, como as do gênero *Vibrio*.

Dentre as proteínas humorais, destacam-se as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas de reconhecimento ou PRP (do inglês pattern recognition proteins), com capacidade de reconhecer especificamente carboidratos da superfície de patógenos, dando início às respostas imunes efetoras, como a aglutinação dos microrganismos invasores e/ou à sua fagocitose facilitada (opsonização) (Marques e Barracco, 2000). A ocorrência destas moléculas na hemolinfa de bivalves foi extensamente relatada, principalmente, as pertencentes à família das C-lectinas, que dependem de cálcio para desempenhar sua função (Odo et al., 1995; Tunkijjanukij et al., 1997; Bulgacov et al., 2004; Minamikawa et al., 2004). A especificidade das lectinas de bivalves parece estar mais direcionada a açúcares N-acetil aminados e sialoconjugados (Suzuki e Mori, 1990; Tunkijjanukij et al., 1998; Wang et al., 2000; Bulgacov et al., 2004).

Outro importante mecanismo de defesa dos invertebrados é o sistema pró-fenoloxidase (proPO). Este sistema envolve uma complexa cascata de reações químicas mediadas por serino-proteases, induzidas por componentes da superfície de microrganismos e 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 L-DOPA, dando origem a intermediários tóxicos como as quinonas e ERO, que culminam com a produção do pigmento escuro melanina. Os intermediários tóxicos produzidos durante o processo de melanização são os principais agentes imuno-efetores 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 (Nappi e Vass, 1993; Vargas-Albores e Barracco, 2001; Cerenius e 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 apresentados bastante inconsistentes (Vargas-

Albores e Barracco, 2001). Em pectinídeos, por exemplo, os poucos trabalhos realizados são controversos quanto à ativação deste sistema por componentes da superfície de microrganismos (Deaton et al., 1999; Luna-González et al. 2003)

Uma vez que um dos pontos críticos do cultivo de pectinídeos é a obtenção de larvas de qualidade em grande quantidade, uma das alternativas para contornar este fator ainda limitante seria a melhoria do estado nutricional e da saúde dos reprodutores. Estudos direcionados à suplementação alimentar com carotenóides, demonstraram que estes compostos incrementam a viabilidade e a sobrevivência larvária de camarões *Litopenaeus vannamei* (Cuzon et al., 2004). Ademais, existem relatos que estas moléculas apresentam atividades antioxidante e imunoestimulante em diversos grupos de animais aquáticos (Kawakami et al., 1998; Amar et al., 2004), e são requeridas para o desenvolvimento e maturação gonádica, fertilização e eclosão em moluscos bivalves (Fariás-Molina, 2001). Todavia, cabe ressaltar que, até o presente momento, não existem relatos sobre a utilização de carotenóides como imunoestimulantes em pectinídeos ou outros bivalves, com exceção do recente estudo da vitamina A no abalone *Haliotis discus* (Fu et al., 2006).

A astaxantina é um carotenóide natural predominante em muitas espécies de peixes marinhos e invertebrados (Bjerkeng et al., 1992; Storebakken e No, 1992). Os moluscos bivalves não são capazes de sintetizar este pigmento, e sua obtenção é feita através da ingestão de organismos fitoplanctônicos, que, por sua vez, são a principal fonte de carotenóides para os animais aquáticos (Johnson e Schroeder, 1995; Fariás-Molina, 2001), e, dentre estes organismos, a microalga *Haematococcus pluvialis* tem se destacado comercialmente por ser uma rica fonte de astaxantina. Foi demonstrado que a astaxantina apresenta uma maior atividade antioxidante comparativamente ao α -caroteno, β -caroteno, luteína, licopeno, canthaxantina e vitamina E (Naguib, 2000; Rengel et al., 2000), e é um dos pigmentos responsáveis pela cor da carne e gônada de muitos animais marinhos (Gu et al., 1997).

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo básico sobre o sistema imune do pectinídeo *N. nodosus* e avaliar a alteração de alguns parâmetros hemato-imunológicos ao longo de seu ciclo reprodutivo, de juvenil a adulto pós-desova, em presença ou não de uma dieta rica em astaxantina. De forma resumida, neste estudo, procedeu-se a caracterização dos hemócitos e sua capacidade de produzir ERO, a determinação dos hemogramas, a detecção de peptídeos antimicrobianos, a determinação da atividade aglutinante, antimicrobiana e da enzima fenoloxidase da hemolinfa nos diferentes estágios do ciclo reprodutivo e em associação à uma dieta com astaxantina.

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Foram utilizados neste estudo indivíduos juvenis medindo de 35 a 45 mm de altura (6 meses de idade) e adultos de 70 a 80 mm (18 meses) da espécie *Nodipecten nodosus* (Linnaeus 1758), provenientes de larviculturas realizadas no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e cultivados na Unidade Experimental da Empresa de Pesquisa

Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI), localizada em Santa Catarina (SC), região sul do Brasil, praia do Canto Grande, Bombinhas (27°12'5.39"S e 48°30'47.70"W).

2.2. Delineamento Experimental

Os pectinídeos juvenis (n=26) e adultos (n=90) foram selecionados no campo e transportados até a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, para os Laboratórios de Moluscos Marinhos (LMM) ou de Imunologia Aplicada à Aqüicultura (LIAA). Os juvenis (J) foram acondicionados em aquários de 35 L, contendo água do mar filtrada, sob aeração constante, com temperatura ambiente e fotoperíodo natural, por 48 h (aclimatação). Os adultos foram separados em diferentes grupos, sendo que o grupo denominado A (adulto, n=18) recebeu o mesmo tratamento que os juvenis. O restante dos animais (n=72) constituiu o grupo dos reprodutores e foi submetido a dois tratamentos distintos: um grupo denominado M (animais maduros) foi mantido por 15 dias em tanques de fibra de vidro de 10 L, com água filtrada (1 µm), esterilizada (UV), a uma temperatura de 19 °C e aeração constante sendo alimentados com uma dieta padrão, composta pelas microalgas vivas *Isochrysis galbana* variedade *Tahiti* (50%), *Chaetoceros muelleri* (25%) e *Skeletonema* sp. (25%) na concentração final de 5×10^4 células.mL⁻¹. Já o segundo grupo (Ma) foi submetido às mesmas condições que o anterior, exceto que a alimentação foi composta por 50% da dieta padrão e 50% de microalgas secas da espécie *Haematococcus pluvialis* (MS NatuRose®, Cyanotech), com a mesma concentração total de células acima descrita. Estas microalgas comerciais são especialmente ricas em astaxantina. Decorridos 15 dias (maturação gonádica), uma parte dos reprodutores M e Ma (n=18 respectivamente) foi destinada à coleta de hemolinfa, enquanto outra foi induzida à desova (grupos D e Da, n=18 respectivamente), através de um tratamento de estresse, que consistiu em: (1) limpeza das conchas, (2) elevação da temperatura até 24°C, (3) banho com água estéril (UV) e (4) exposição ao ar (3 min) (adaptado de Rupp e Poli, 1994; Rupp et al., 1997). Após 24 h, os animais que desovaram (D e Da, n=18 respectivamente) foram destinados à coleta de hemolinfa.

2.3. Coleta de hemolinfa

A extração da hemolinfa de todos os grupos (J, A, M, Ma, D e Da) foi realizada a partir do músculo adutor liso, através da inserção de uma agulha (21G) ligada a uma seringa estéril de 1mL. Foram realizadas duas extrações de hemolinfa, imediatamente sucessivas, de cada animal. Na primeira, a hemolinfa de 12 animais de cada grupo foi coletada, de forma individual, em presença de 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), na proporção de 3:1 (v/v) e armazenado a 4°C. A segunda, imediatamente após a primeira, foi realizada sem fixador. O sangue assim coletado foi tratado de duas formas distintas para a obtenção de hemolinfa total (HT) e de plasma (PL), sob forma de 3 pools de 6 animais para o grupo J e de 4 animais para os demais grupos. Para obtenção da HT, a hemolinfa foi congelada e descongelada três vezes sucessivamente para lise celular e, em seguida, centrifugada a 8.000 g por 10 min a 6°C. O sobrenadante, assim obtido, foi separado e armazenado a -20°C e denominado neste estudo de HT. Para a obtenção do

PL, a hemolinfa coletada foi diretamente centrifugada a 800 g por 10 min e o sobrenadante ou plasma separado e armazenado a -20°C.

Para as análises de espécie reativas de oxigênio (ERO) e detecção de PAM, a hemolinfa foi coletada de forma diferenciada e está descrita nos itens correspondentes.

2.4. Caracterização dos hemócitos

2.4.1 Microscopia de contraste de fase (MCF)

As amostras de hemolinfa fixadas foram depositadas em finas camadas, entre lâmina e lamínula, e visualizadas ao MCF para observação, identificação dos tipos de hemócitos presentes e registro fotográfico quando oportuno.

2.4.2 Coloração Giemsa

Amostras individuais (100µL) de hemolinfa fixada de 6 animais de cada grupo foram espalhadas gentilmente sobre lamínulas perfeitamente limpas, depositadas em microplacas de 6 poços, em presença de 20 mM de CaCl₂ (concentração final) e deixadas por 20 min para a adesão celular. Em seguida, os hemócitos foram corados com uma solução de Giemsa em PBS (1:6 v/v) por 15 min, lavados em água destilada. As lamínulas foram então montadas com Bálsamo do Canadá sobre lâminas, observadas ao microscópio de luz e fotografadas quando oportuno.

2.4.3 Detecção de mitilinas e defensinas por imunofluorescência indireta (IF)

A detecção de peptídeos antimicrobianos nos hemócitos de *N. nodosus* foi realizada de acordo com o método descrito por Destoumieux et al. (2000). Em breve, a hemolinfa de vieiras adultas (n=5) foi coletada em MAS estéril (1:3 v/v), centrifugada (600 g por 10 min a 6°C) e o pellet de hemócitos ressuspendido em MAS estéril (10⁶ células.mL⁻¹) Em seguida, 100 µL da suspensão de hemócitos foi espalhada cuidadosamente em lamínulas de vidro 22 x 22 mm apirogênicas e depositadas em microplacas de 6 poços, na presença de 20 mM de CaCl₂ (concentração final), permitindo a adesão celular por cerca de 20-30 min. A adesão das células foi monitorada em microscópio invertido. Após adesão, as monocamadas celulares foram fixadas com paraformaldeído 4% em MAS por 10 min e lavadas (3x) em tampão PBS (DIFCO®). A presença de mitilinas e defensinas nos hemócitos foi avaliada utilizando-se anticorpos monoespecíficos anti-mitilina (anti-Myt-B) e anti-defensina (anti-MGD-1) de *Mytillus galloprovincialis*, produzidos em coelho e gentilmente cedidos pela Dra. Evelyne Bachère da Universidade de Montpellier, Montpellier, França. Para tal, as monocamadas de hemócitos foram tratadas com uma solução de permeabilização (25 mM Tris, 0,2 % gelatina, 0,5 % Triton X 100, 50 mM cloreto de amônio, pH 7,2) por 10 min, saturadas por 1 h com tampão PBS contendo 0,1 % de Tween-20 e 5 % de leite em pó desnatado e lavadas em PBS-Tween-20 3x durante 3 min. As monocamadas foram então incubadas com 100 µL de anti-Myt-B ou anti-MGD-1 (20 µg.mL⁻¹) diluídos em PBS-Tween-20, contendo 0,5 % de leite em pó desnatado. Após incubação, as monocamadas foram lavadas com PBS-Tween-20 (3x durante 5 min) e tratadas com anticorpos

anti-coelho conjugados com FITC (1:500 em PBS-Tween-20 contendo 0,5% de leite em pó desnatado e 0,005 % de Azul de Evans), por 15 min no escuro. As monocamadas foram então novamente lavadas em PBS-Tween-20 (3x por 3 min), montadas em lâminas com glicerina-bicarbonato (pH 9,0), observadas e fotografadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss – Axiostar Plus). Controles negativos foram realizados utilizando-se soro pré-imune de coelho em substituição aos anticorpos primários. Os ensaios foram todos feitos em duplicata e repetidos três vezes.

2.5. Hemogramas

2.5.1 Contagem total de hemócitos (*Total haemocyte count - THC*)

A contagem total de hemócitos foi estimada em câmara de Neubauer, a partir das amostras individuais de hemócitos fixados de 12 animais de cada grupo.

2.5.2 Contagem diferencial de hemócitos (*Differential haemocyte count - DHC*)

A porcentagem relativa dos hemócitos circulantes foi determinada a partir de lâminas coradas com Giemsa (6 animais por grupo), sendo contadas randomicamente 100 células por lâmina.

2.6. Detecção e caracterização de aglutininas/lectinas da hemolinfa

A presença de aglutininas/lectinas de ocorrência natural foi investigada incubando-se o PL de *N. nodosus* com uma variedade de eritrócitos de vertebrados. Para tal, amostras de 50 µL de PL foram diluídas seriadamente em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4), em microplacas de 96 poços (fundo em U), sendo adicionado, a seguir, 50 µL de uma suspensão de eritrócitos a 2% em TBS-1. Nos controles, o plasma foi substituído por TBS-1. As microplacas foram incubadas por 2 h em câmara úmida, e o título aglutinante foi expresso como o recíproco da maior diluição em que ainda foi possível observar aglutinação. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e repetidas 3 vezes.

Após determinar o tipo de eritrócito capaz de gerar o maior título de aglutinação (no presente caso, eritrócitos de cão), apenas este tipo de hemácia foi utilizado para comparar a atividade aglutinante entre os diferentes grupos de vieiras (J, A, M, Ma, D e Da), tal como descrito acima.

A cálcio-dependência da atividade aglutinante do PL das vieiras foi investigada através do uso de quelantes de íons divalentes (EDTA) e especificamente de cálcio (EGTA). Para tal, uma amostra de 50 µL de PL foi diluída seriadamente em TBS-1 e incubada com 50 µL de diferentes concentrações de EDTA (1, 5, 10, 20 e 100 mM) ou EGTA (2 e 20 mM) em TBS-1, por 30 min em câmara úmida, antes de se proceder ao ensaio convencional de aglutinação acima descrito com eritrócitos de cão. A inibição ou não da atividade aglutinante foi então registrada.

A especificidade das lectinas foi investigada incubando-se 4 unidades de aglutinação (plasma diluído 1:8 em TBS-1) com diferentes açúcares (200 mM), diluídos seriadamente em TBS-1 e incubado por 1h em câmara úmida. Decorrido este tempo, procedeu-se o ensaio convencional de

aglutinação acima descrito, com eritrócitos de cão, sendo a inibição da aglutinação registrada. Os ensaios foram sempre feitos em duplicata e repetidos 3 vezes.

2.7. Detecção da atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da PO foi determinada incubando-se amostras (50 μ L) de HT dos diferentes grupos com igual volume do substrato enzimático L-DOPA (3 mg.mL⁻¹) e de 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, 20, 40 e 60 min. Nos controles, a L-DOPA ou alternativamente a HT (branco) foram substituídas por TBS-2. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U), através da variação da absorbância por minuto, sendo que uma (1) unidade de atividade enzimática equivale ao aumento de 0,001 na absorbância por min a 20°C. A atividade específica da enzima foi expressa como supracitado, porém levando em consideração a quantidade de proteína da amostra (U mg⁻¹ de proteína) (Söderhäll e Häll, 1984). Todos os ensaios foram realizados com 3 replicatas, e repetidos 3 vezes.

2.8. Fagocitose e produção de ânion superóxido

A avaliação da fagocitose e produção de ânion superóxido pelos hemócitos de *N. nodosus* foi realizada através da técnica de redução de NBT para formazan, segundo o método descrito por Barracco et al. (1999), com algumas adaptações. Nestes ensaios, a hemolinfa dos diferentes grupos de animais foi coletada em MAS estéril, sob forma de 2 pools de 3 animais, com exceção do grupo J, onde os pools foram feitos a partir de 4 animais. A concentração de hemócitos foi ajustada para 0,5 x 10⁶ células.mL⁻¹ com MAS. As suspensões de hemócitos foram então centrifugadas a 600 g por 10 min e o MAS substituído por um volume igual de TBS-3 (Tris 50 mM, 0,03% CaCl₂, 3 % NaCl, pH 8,4). Amostras de 100 μ L de suspensão de hemócitos foram adicionadas a diferentes poços de uma microplaca de 96 poços (fundo chato), permitindo a adesão celular por cerca de 20-25 min, à 25°C em câmara úmida. Após adesão (monitorada em microscópio invertido), as monocamadas celulares foram incubadas com 200 μ L de TBS-3, acrescido de 0,1% NBT (Sigma), 0,1% de soro-albumina bovina (BSA, Sigma) e 0,15% do indutor zymosan (Sigma), por 45 min, no escuro, sob leve agitação, à 25°C. O sobrenadante foi então removido e as monocamadas fixadas com metanol absoluto por 10 min, lavadas em metanol 70% e secadas em temperatura ambiente. A seguir, cada poço recebeu uma solução de KOH (120 μ L, 2 M) e DMSO (140 μ L) para solubilizar o azul de formazan citoplasmático. Nos ensaios controles, o zymosan foi substituído 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. A produção de ânion superóxidos pelos hemócitos foi calculada pela razão entre a densidade óptica dos hemócitos estimulados pelo zymosan e a dos hemócitos controles. Foram feitas cinco replicatas para cada ensaio.

2.9. Atividade antimicrobiana

A hemolinfa total (HT) das vieiras adultas (grupo A) foi avaliada quanto à sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* – A270), Gram-negativas (*Escherichia coli* – D363) e duas espécies de vibrios marinhos (*Vibrio harveyi* e *V. anguillarum*, cedidos pela Dra. Evelyne Bachère da Universidade de Montpellier, Montpellier, França). Os vibrios foram cultivados em meio de cultura PWS (do inglês peptone water saline: 1,5 % de peptona, 1,5% de NaCl, pH 7,2), enquanto as outras bactérias em meio de cultura LB (Luria Bertani: 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,4) por 24 h a 25 e 37°C, respectivamente. Após atingir o crescimento exponencial, as suspensões de vibrios foram diluídas em PWS e as demais bactérias em caldo simples ou PB (do inglês poor broth: 1% peptona, 0,5% NaCl, pH 7,4), para uma $DO_{630\text{ nm}} = 0,001$ para uso nos ensaios antibacterianos.

Os ensaios foram realizados diluindo-se seriadamente 150 µL da HT do grupo A em PWS ou PB, conforme o microrganismo testado, em microplacas de 96 poços (fundo chato). Foi então adicionado um volume de 20 µL das respectivas suspensões microbianas em todos poços. Nos controles, a HT foi substituída por uma solução salina estéril. Foi realizado também um controle com meio PB contendo 0,4 M de NaCl em substituição à HT, para verificar a influência da salinidade (hemolinfa de animais marinhos) sobre o crescimento de *M. luteus* e *E. coli*. As placas foram então incubadas sob agitação leve por 24 h a 25°C para os vibrios e a 37°C para *M. luteus* e *E. coli*. O crescimento dos microrganismos foi determinado em leitora da microplaca $DO_{630\text{ nm}}$ (adaptado de Destoumieux et al., 1999; Mitta et al., 2000a). Os ensaios foram realizados sempre em duplicata.

2.10. Determinação da concentração total de proteínas (CP)

A CP foi estimada nas frações HT e PL de cada grupo de vieira com base no método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.11. Análise estatística

Nos dados de THC, DHC, atividade da PO, concentração de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e atividade aglutinante foi aplicado a ANOVA ($\alpha < 0,05$) para comparar as diferenças das variâncias entre os diferentes grupos (J, A, M, Ma, D e Da) para cada parâmetro, seguida do teste de comparação de médias de Tuckey. Os valores em porcentagem de HG/HH foram transformados para arcoseno, os valores de atividade da PO e THC para \log_{10} e os da atividade aglutinante para \log_2 , por não apresentarem homogeneidade de variância.

Foi aplicado o Teste t de Student para avaliar a indução da produção da ERO pelo zymosan e da atividade da PO pelo pH alcalino, em cada grupo.

3. Resultados

Não houve mortalidade das vieiras em nenhum grupo estudado, incluindo os tratados com astaxantina, durante toda a realização do experimento em laboratório.

3.1. Caracterização dos hemócitos

Foram identificados dois tipos celulares básicos na hemolinfa de *N. nodosus*: hemócitos hialinos (HH) e hemócitos granulares (HG) (Fig. 1). Os HG são células de tamanho variado (6-13 μm) de formato esférico, ovalado ou fusiforme, cujo citoplasma caracteriza-se pela presença de grânulos abundantes ($\leq 1\mu\text{m}$), de conteúdo basófilo ou eosinófilo na coloração Giemsa. Seu núcleo (3 a 6 μm) pode apresentar-se caracteristicamente polimórfico, assumindo aspectos riniforme, ou bi ou multi-lobado (Fig. 1: B-I). Os grânulos dos HG reagiram fortemente aos anticorpos monoespecíficos produzidos contra as mitilinas e defensinas de *Mytilus galloprovincialis*, sugerindo a presença de peptídeos semelhantes em seu interior (Fig. 1: G-M). Entretanto, não foi possível detectar, até o momento, a ocorrência de ambas as moléculas por biologia molecular (RT-PCR), através de iniciadores desenhados a partir de seqüências gênicas disponíveis para mexilhões em bancos de dados públicos (GenBank). Já os HH são células usualmente menores (5-8 μm), de aspecto esférico ou ovalado, com citoplasma geralmente basófilo na coloração Giemsa, e desprovidos de grânulos. Seu núcleo (3-5 μm) apresenta-se menos polimórfico que o dos HG (Fig. 1: A-F).

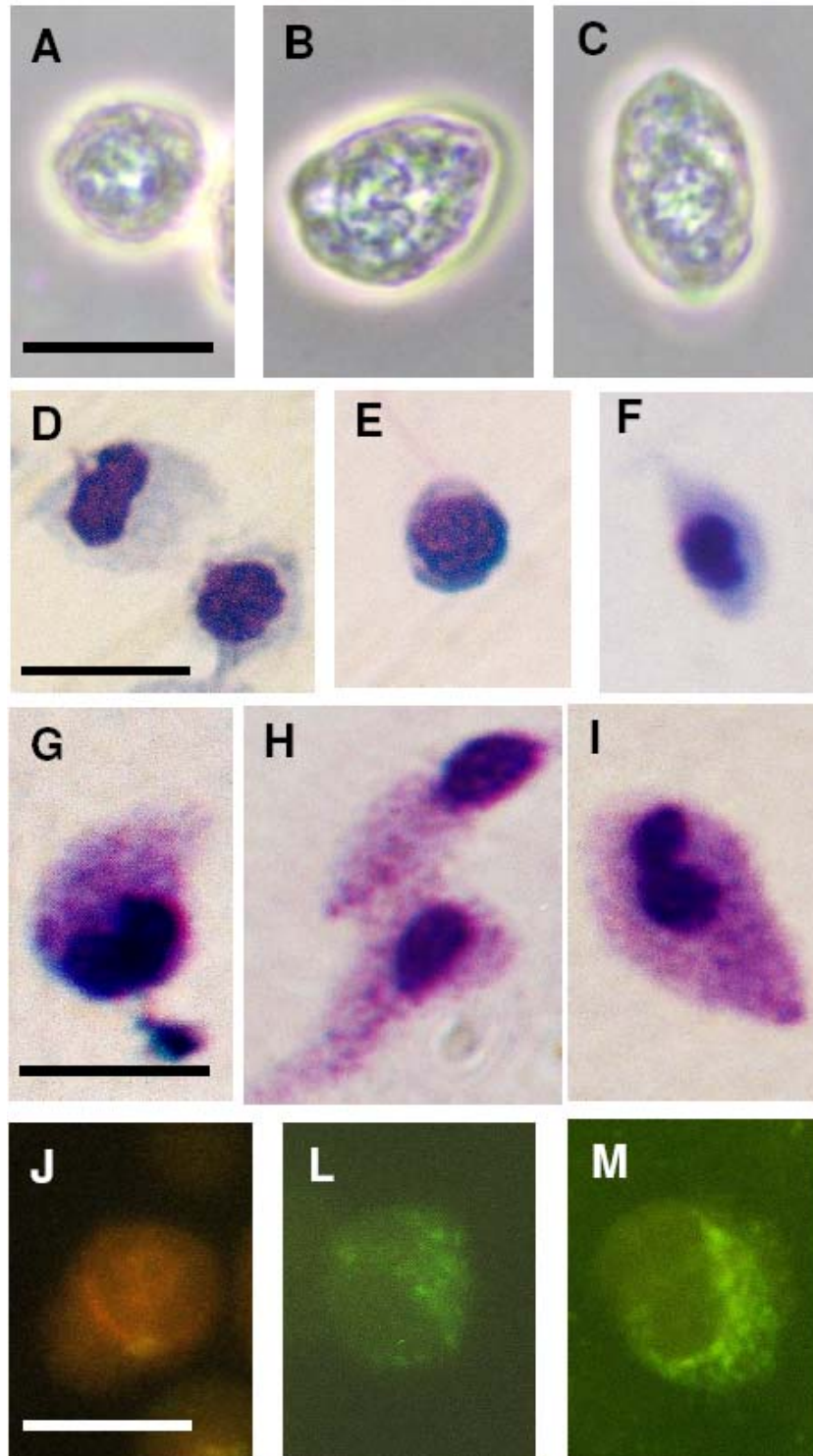


Fig. 1. Hemócitos da hemolinfa de *Nodipecten nodosus* observados ao microscópio de contraste de fase (A-C), coloração Giemsa (D-I) e imunofluorescência indireta (J-M), (A) Hemócito hialino (HH), (B) Hemócito granular (HG) com núcleo riniforme, (C) HG com núcleo circular, (D, E e F) hemócitos hialinos, (G). HG com grânulos basófilos e núcleo riniforme, (H) HG com grânulos eosinófilos e núcleo esféricos, (I) HG com núcleo lobado ; (J) hemócito, controle negativo, (L) hemócito positivo para mitilina e (M) hemócito positivo para defensina. A barra corresponde a 10 μ m.

3.2. Hemogramas

3.2.1 Contagem total de hemócitos - THC (Total haemocyte count)

A contagem total de hemócitos (THC) ao longo do desenvolvimento de *N. nodosus* mostrou um aumento significativo destas células do grupo juvenil (J: $18,5 \pm 3,1$ céls.mL⁻¹) para o grupo adulto (A: $24,3 \pm 1,1 \times 10^6$ céls.mL⁻¹), havendo, em seguida, uma queda brusca de seu número no grupo de animais com gônada madura (M: $11,8 \pm 1,1$ céls.mL⁻¹) e retornando novamente aos valores do grupo A, logo após a desova (D: $25,8 \pm 2,8$ céls.mL⁻¹) (Fig. 2). Não houve diferenças significativas nos animais tratados ou não com a dieta rica em astaxantina (Ma: $13,5 \pm 1,4$ e Da: $24,8 \pm 2,5$ céls.mL⁻¹).

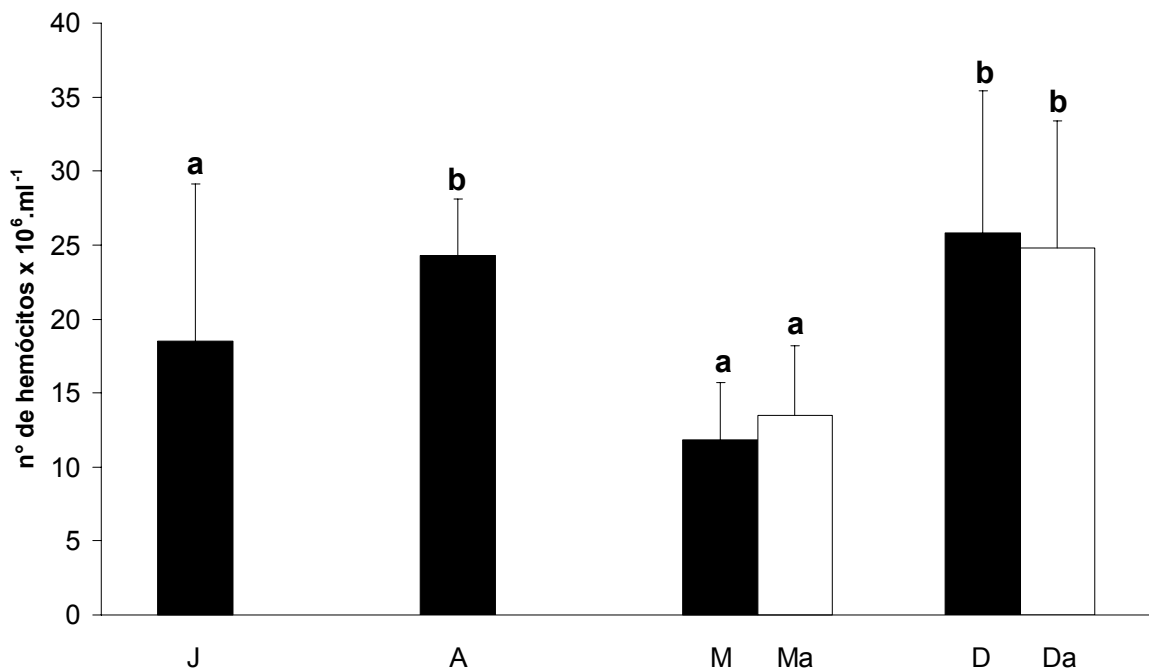


Fig. 2. Contagem total de hemócitos dos diferentes grupos de vieiras. As barras representam a média \pm desvio padrão de 12 indivíduos em cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.2.2 Contagem diferencial de hemócitos- DHC (Differential haemocyte count)

Os HG, células consideradas as mais imunologicamente ativas, mostraram-se sempre mais abundantes em todos os grupos estudados. Nas vieira adultas (grupo A), esta população celular atingiu quase 100% do total de hemócitos (A: HG – 99,2 %; HH – 0,8 %), enquanto nos juvenis atingiu os menores valores (J: HG – 67,3 %; HH – 32,7 %) (Figura 3). De forma similar ao observado para a THC, houve uma diminuição significativa da porcentagem de HG nos animais com gônada madura (M: HG – 90,3%), havendo em seguida um aumento deste tipo celular nos animais desovados (D: HG – 96,2 %). Novamente, a dieta rica em astaxantina não levou a uma elevação significativa na proporção de HG, embora tenha havido uma tendência de aumento deste tipo celular nos animais tratados com este carotenóide (Ma: HG – 92,7 %, Da: HG – 96,7 %) (Fig. 3).

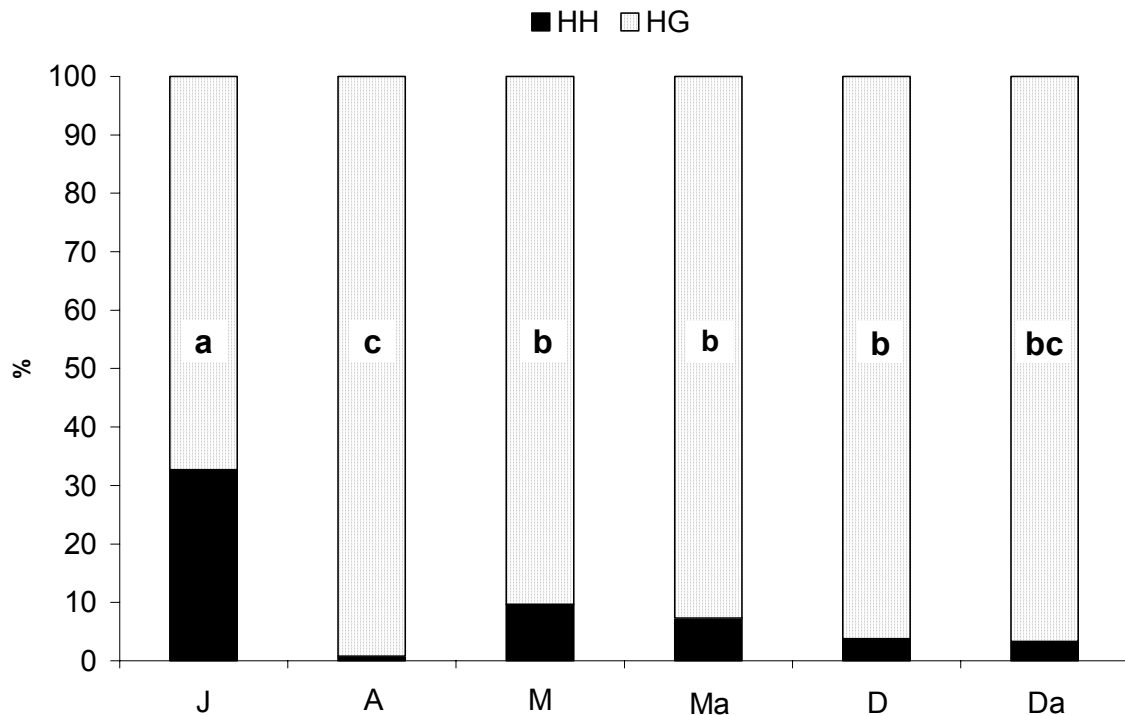


Fig. 3. Porcentagem de hemócitos granulares (HG) e hialinos (HH) nos diferentes grupos de vieira. As barras representam a porcentagem média de 6 animais de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.3. Concentração de proteínas totais (CP)

Seguindo a mesma tendência descrita para os hemogramas, houve um aumento significativo dos valores da CP do plasma (PL) e hemolinfa total (HT: PL + produtos exocitados pelos hemócitos) dos juvenis (J: PL = 236 ± 109 e HT = 303 ± 133 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para os adultos (A: PL = 660 ± 60 e HT = 890 ± 47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), havendo em seguida um decréscimo marcante nos animais maduros, prontos para a desova (M: PL: 362 ± 43 ; HT: 559 ± 46 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e tendendo a elevar-se novamente nos animais desovados (D: PL: 442 ± 20 ; HT: 583 ± 28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), porém de forma não significativa, (Fig. 4). Nos animais tratados com a dieta rica em astaxantina, a CP mostrou uma tendência (não significativa) de apresentar valores mais altos comparativamente aos animais alimentados com a dieta padrão (Ma: PL = 335 ± 39 ; HT = 537 ± 103 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e Da: PL = 443 ± 35 HT = 685 ± 129 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

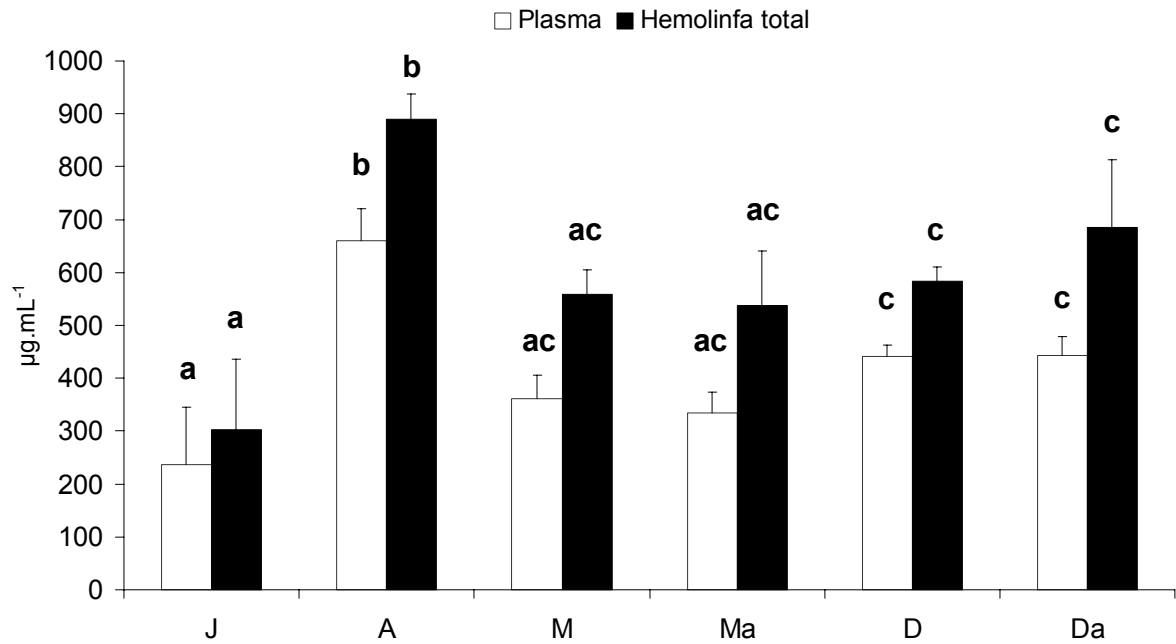


Fig. 4. Concentração de proteínas totais do plasma (PL) e hemolinfa total (HT) dos diferentes grupos de vieiras. As barras representam a média \pm desvio padrão dos 3 pools de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.4. Atividade aglutinante do plasma, cálcio dependência e especificidade por açúcares

Os ensaios de hemaglutinação, utilizando diferentes eritrócitos de vertebrados, permitiram detectar a presença de aglutininas/lectinas de ocorrência natural no PL de *N. nodosus*. Os maiores títulos de aglutinação foram obtidos contra eritrócitos de cão e coelho (Tabela 1). Esta atividade mostrou-se parcialmente dependente de cálcio, uma vez que os quelantes de íons divalentes (EDTA) e especificamente de cálcio (EGTA) reduziram apenas parcialmente a reação aglutinante (Tabela 1). As lectinas de *N. nodosus* mostraram forte afinidade pelo monossacarídeo D-galactose e para sialoconjugados, uma vez que a atividade aglutinante do PL (4UA) foi completamente inibida por concentrações baixas destes carboidratos (Tabela 1). Monossacarídeos D-Manose e D-fucose também foram capazes de inibir a atividade aglutinante do PL, mas em concentrações muito altas (50 mM).

Tabela 1. Atividade hemaglutinante do plasma de adultos de *N. nodosus* contra diferentes eritrócitos de vertebrados, cálcio dependência e especificidade por açúcares.

Eritrócitos	Título hemaglutinante
Cão	32
Coelho	32
Humano B	8
Humano A	4
Humano O	1
Rato	4
Cobaia	2
Camundongo	n.a.
Carneiro	n.a.
Galo	n.a.
Tilápia*	n.a.
Dependência de cálcio**	
EDTA	
10-100 mM	8
1-5 mM	16
EGTA	
20 mM	8
2 Mm	16
Inibição por açúcar**	
Monossacarídeos	Concentração inibitória (mM)
D-Galactose	3,12
D-Manose	50
D-Fucose	50
GalNAc	n.i.
GlcNAc	n.i.
Sialoproteínas (mg.mL⁻¹)	
BSM	0,0781
Fetuína	0,25

n.a.: não aglutinou; n.i.: não inibiu; BSM: mucina da glândula submaxilar bovina; * *Oreochromis niloticus*; ** nestes ensaios foram utilizados eritrócitos de cão

A comparação do título aglutinante do PL dos diferentes grupos de vieiras foi realizada utilizando-se apenas eritrócitos de cão (que forneceram os maiores títulos aglutinantes = 32). Os resultados obtidos mostraram que os animais recém desovados apresentaram os menores títulos aglutinantes (D = 16), sendo estes valores significativamente diferentes apenas daqueles dos juvenis (J = 32) (Fig. 5), que foi o grupo que mostrou os maiores valores. Mais uma vez, os animais alimentados com a dieta rica em astaxantina não apresentaram diferenças significativas com o grupo de animais tratados com a dieta padrão (Fig. 5).

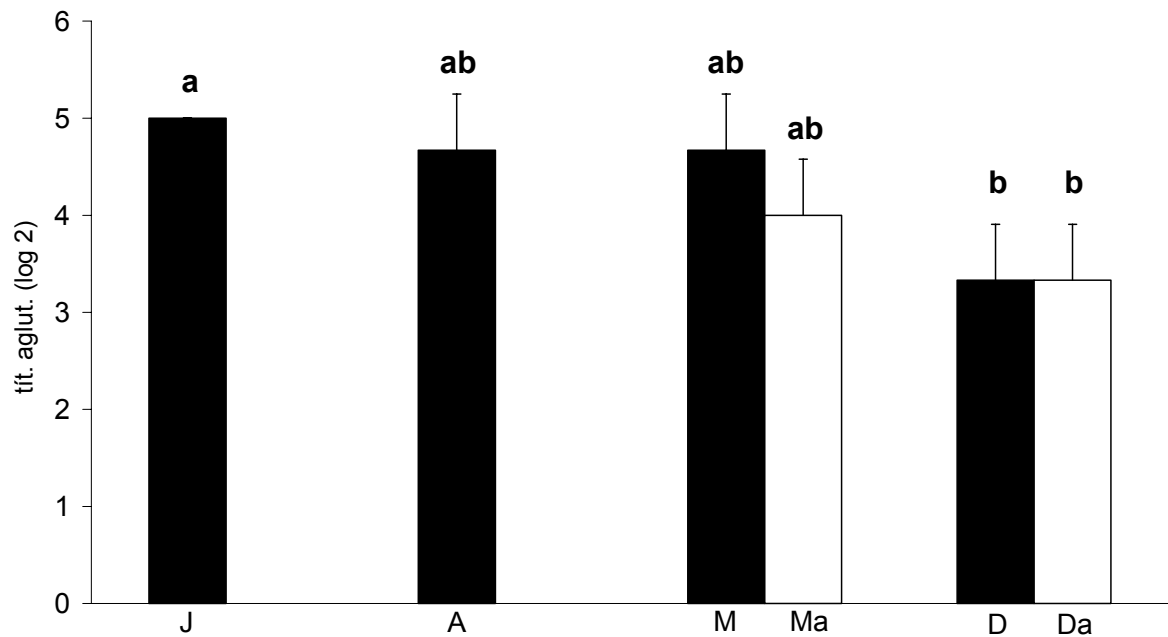


Fig. 5. Título aglutinante do plasma (PL) dos diferentes grupos de vieiras contra eritrócitos de cão. As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 pools de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

3.5. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da enzima fenoloxidase (PO) da hemolinfa de *N. nodosus* foi inicialmente estudada em presença de vários indutores, sabidamente capazes de ativar a forma zimogênica pró-fenoloxidase (proPO) em PO, como a serino-protease tripsina, componentes da superfície de microrganismos (LPS e β -1,3-glicanas), detergentes Triton e SDS e diferentes condições de pH. Contudo, nenhum destes indutores convencionais foi, surpreendentemente, capaz de estimular a atividade da PO, com exceção do pH alcalino (pH 9,0). A partir desta constatação, a atividade da PO dos diferentes grupos de vieiras foi sempre avaliada utilizando-se pH = 9,0 como indutor da enzima. Foram evidenciados valores de atividade específica da PO maiores nos juvenis (J: $445,8 \pm 126,5$ U) que nos adultos (A: $145 \pm 6,9$ U) (Fig. 6). Nos animais maduros sexualmente, a atividade da PO eleva-se novamente (M: $335,8 \pm 22,6$ U), e estes valores são mantidos após a desova (D: $299,3 \pm 114,1$ U). Nos animais tratados com a dieta rica em astaxantina, a atividade da PO apresentou uma redução, apesar de não significativa (Ma: $254,3 \pm 48,3$; Da: $226,6 \pm 28,1$ U), em relação aos grupos correspondentes alimentados apenas com a dieta padrão, sugerindo uma atuação antioxidante deste suplemento alimentar. É interessante notar, que nos animais recém-desovados alimentados com dieta padrão (grupo D), a atividade da PO em pH fisiológico foi significativamente maior do que em animais adultos e maduros (grupos A e M), a qual não foi capaz de ser induzida significativamente pelo pH alcalino (Fig. 6), sugerindo um estresse nestes animais causado pela desova. Este aumento da PO em pH fisiológico não é observado no mesmo grupo de animais cuja dieta foi suplementada com astaxantina (grupo Da) (Fig. 6), indicando um possível efeito protetor do suplemento alimentar no que diz respeito a este parâmetro imunológico. Cabe ainda salientar que a alta atividade da PO nos

animais juvenis (grupo J) pode ser decorrente da baixa concentração protéica da sua hemolinfa total (Fig. 4).

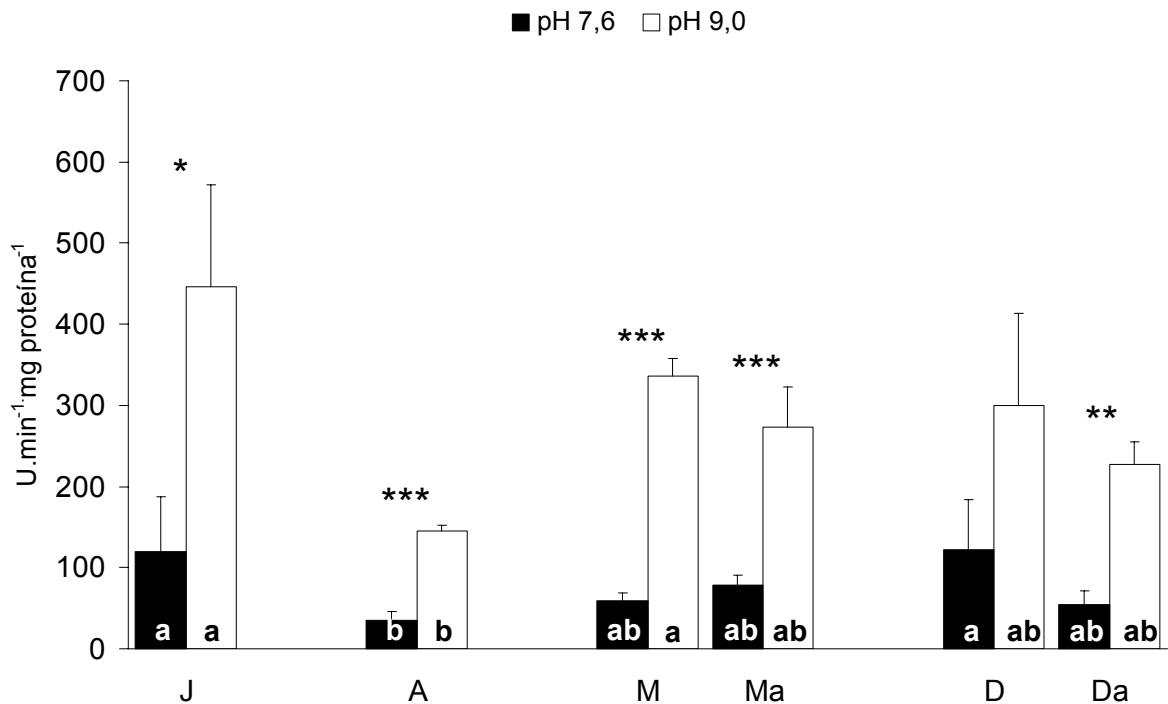


Fig. 6. Atividade da enzima PO ($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) na hemolinfa total dos diferentes grupos de vieiras em pH 7,6 e 9,0. As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 pools de animais de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p > 0,001$ representam diferença significativa pelo teste t de Student entre o pH 7,6 e 9,0 em cada grupo.

3.6. Fagocitose e produção de ERO (ânions superóxido) pelos hemócitos

A produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *N. nodosus* durante o processo de fagocitose de partículas de zymosan foi estimada pela redução de NBT a formazan. Nossos resultados mostraram que não houve estimulação da produção deste ânion nos juvenis (Fig. 7). Já nos adultos houve uma evidente indução da produção de ERO (3,1x) que se manteve nos animais maduros sexualmente alimentados com dieta rica em astaxantina (3,9x), mas não nos alimentados com dieta padrão, onde não houve indução. Após a desova, os animais do grupo alimentado apenas com a dieta padrão apresentaram uma produção de ERO basal bastante elevada, indicando uma provável situação de estresse causado pela maturação e desova (Fig. 7). No entanto nos animais alimentados com a dieta suplementada com astaxantina, interessante, foi constatada uma leve indução (1,6x).

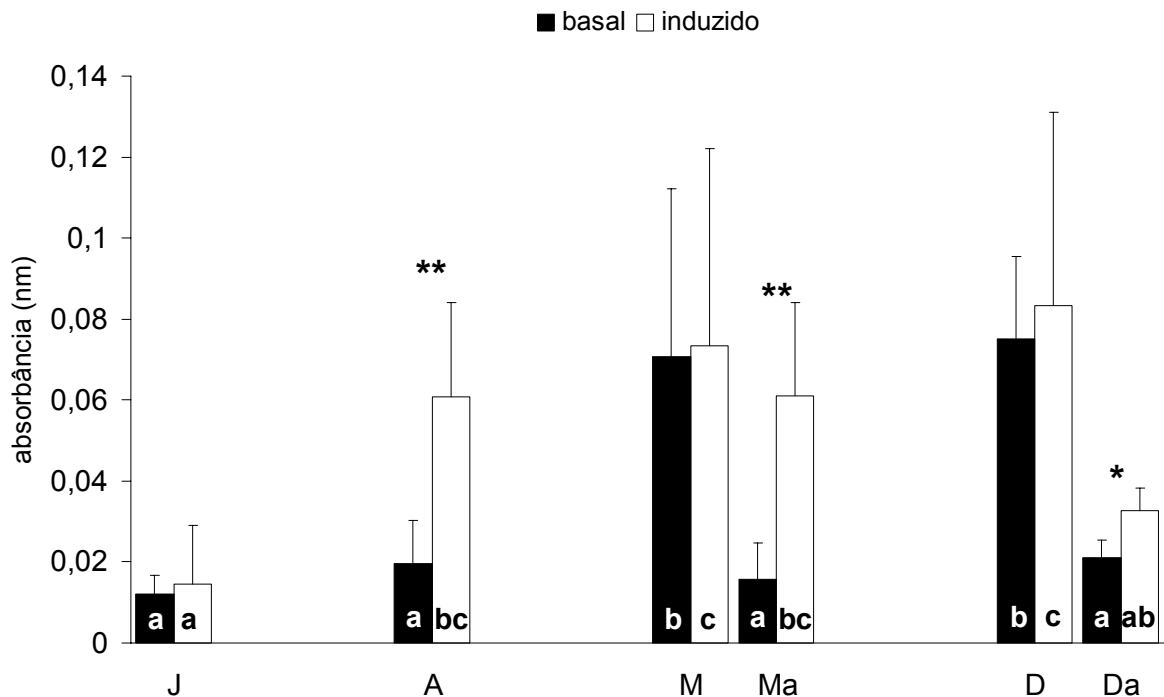


Fig. 7. Produção basal de ERO, e induzida por *zymosan*, pelos hemócitos de *N. nodosus* dos diferentes grupos de animais. As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 *pools* de cada grupo. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

* $p < 0,05$ e ** $p > 0,001$ representam diferença significativa pelo teste t de Student entre a produção de ERO basal e induzida pelo *zymosan* em cada grupo.

3.7. Atividade antimicrobiana

Os ensaios antibacterianos da hemolinfa (HT) de *N. nodosus* contra diferentes bactérias Gram positivas e negativas não levaram a nenhum resultado positivo, apesar de termos detectado peptídeos antimicrobianos nos grânulos dos HG por imunomarcagem (Fig. 1). Não houve atividade detectável contra os vibrios marinhos, *V. harveyi* e *V. anguillarum* e apenas um efeito muito reduzido sobre a bactérias Gram positiva *M. luteus* e Gram negativa *E. coli*, nas maiores concentrações de HT.

4. Discussão

Como mencionado anteriormente, apesar do grande potencial da vieira *Nodipecten nodosus* para aqüicultura, poucos estudos existem ainda sobre a biologia desta espécie. Seu cultivo vem sendo tentado no Brasil desde os anos 90, mas encontra-se ainda em estágio experimental, em vista da dificuldade em se obter larvas e sementes em larga escala e de forma sustentável. Além do mais, os reprodutores apresentam uma certa fragilidade às condições de cultivo, o que limita ainda mais o sucesso da atividade. Neste contexto, o estudo do sistema imune de *N. nodosus*, ainda totalmente desconhecido, poderia gerar subsídios importantes para o monitoramento das condições de saúde destes animais durante seu cultivo, podendo contribuir de forma importante para o sucesso desta atividade.

O presente estudo iniciou-se com a identificação e caracterização das células imunocompetentes ou hemócitos da hemolinfa de *N. nodosus*. Existe uma certa controvérsia na

literatura a respeito dos tipos celulares presentes na hemolinfa de pectinídeos. Auffret (1988); Henry et al. (1990); Mortensen e Glette (1996) reportaram a ocorrência de uma única população de células circulantes na hemolinfa ou hemócitos hialinos (HH) em *Chlamys varia* e *Pecten maximus*, não sendo observados os hemócitos granulares (HG), consideradas as principais células imunocompetentes de moluscos (Vargas-Albores e Barracco, 2001). A ausência dos HG foi também reportada na hemolinfa de *N. nodosus* em estudos preliminares realizados por Vargas-Albores e Barracco (2001). Por outro lado, recentemente, foi relatada a presença de HG, além de HH, na hemolinfa de *Chlamys farreri* (Xing et al., 2002; Xing e Zhan, 2005), *Argopecten irradians* (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2006), e *Argopecten purpuratus* (Gonzalez e Arenas, 2002). Inicialmente, em nossas análises também encontramos apenas a população de HH na hemolinfa de *N. nodosus*, a partir da utilização de métodos hematológicos convencionais (esfregaços de hemolinfa corados pelo Giemsa). Contudo, após uma longa padronização e adaptação de métodos alternativos (diferentes modos de coleta de hemolinfa, diferentes soluções anti-agregantes, fixadores e corantes) foi possível detectar a presença de HG na hemolinfa de *N. nodosus*, contrariando assim, as observações preliminares de Vargas-Albores e Barracco (2001). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se monocamadas de hemócitos em lamínulas de vidro, coradas pelo Giemsa (vide item 2.4.2). A dificuldade em se detectar HG, que constitui o tipo de hemócito mais abundante na hemolinfa de *N. nodosus*, através de métodos clássicos, levanta a questão sobre a real ausência deste tipo celular em diversas outras espécies de pectinídeos. É provável que a mesma dificuldade técnica encontrada neste estudo em microscopia de luz, possa também ter ocorrido para outras espécies de vieiras.

O número de hemócitos circulantes (THC) na hemolinfa de *N. nodosus* ($1,2$ a $2,6 \times 10^7$ células.mL⁻¹) assemelha-se ao encontrado em outros pectinídeos, como *Argopecten irradians* ($3,8 \times 10^7$ células.mL⁻¹) (Zhang et al., 2006) e *Chlamys farreri*, ($0,7 \times 10^7$ células.mL⁻¹) (Liu et al., 2004). Foi constatado em *N. nodosus* um aumento significativo do número de hemócitos dos juvenis para adultos (1,3x), havendo em seguida uma queda expressiva da THC nos animais maduros sexualmente (2,2x), e voltando a aumentar logo após a desova. Esta mesma tendência foi também observada para a contagem diferencial de hemócitos (DHC). A proporção de HG de *N. nodosus* foi sempre superior (88% em média) à de HH em todos os grupos analisados. Estes mesmos resultados foram também relatados em *Chlamys farreri* (Xing et al., 2002). Por outro lado, a flutuação dos HG ao longo do ciclo reprodutivo de *N. nodosus*, mostrou um perfil semelhante à THC, ocorrendo um aumento da porcentagem de HG dos juvenis para adultos, seguido de um declínio destas células nos animais prontos para a desova, e um posterior aumento imediatamente após desova. Este declínio geral dos hemogramas por ocasião da maturação gonádica, sugere que esta etapa do desenvolvimento representa uma condição particularmente estressante para as vieiras. Poder-se-ia supor que neste momento crucial da vida destes animais, as vieiras investem preferencialmente suas reservas energéticas na maturação da gônada em detrimento de seu sistema imune. Por outro lado, o tratamento das vieiras com a dieta rica no carotenóide astaxantina não resultou em uma alteração significativa do padrão dos hemogramas, não parecendo, assim, ter uma influencia positiva neste parâmetro imunológico.

A ocorrência de moléculas antimicrobianas potentes nos hemócitos granulares de mexilhões *Mytilus edulis* (Charlet et al., 1996) e *M. galloprovincialis* (Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999a,b; 2000a,b) nos fez buscar moléculas semelhantes nos hemócitos de *N. nodosus*. Em *M. galloprovincialis* foram identificadas várias classes de peptídeos antimicrobianos (PAM), destacando-se as defensinas e mitilinas, que foram também descritas em *M. edulis* (Charlet et al., 1996; Tincu e Taylor, 2004). Defensinas e, principalmente, mitilinas apresentam uma atividade antimicrobiana potente e de amplo espectro contra uma grande variedade de bactérias e fungos, tendo efeito inclusive contra vibrios marinhos (mitilinas), capazes de causar infecções devastadoras nas larviculturas de bivalves (Lambert et al., 1998; Vandenberghe et al., 2003; Schulze et al., 2006). Muito recentemente, foram também identificadas defensinas nos hemócitos da ostra do pacífico *Crassostrea gigas* (Gonzalez et al., 2007). No que se refere aos pectinídeos, o primeiro relato da ocorrência de PAM foi a detecção da clamisina nas vísceras de *Chlamys islandica* (Nilsen et al., 1999). Na vieira *N. nodosus*, defensinas e mitilinas foram claramente detectadas nos hemócitos granulares desta espécie, utilizando-se anticorpos mono-específicos produzidos contra estes peptídeos de *M. galloprovincialis*. A imunodeteção destes PAM nos levou a desenhar iniciadores específicos para identificar e clonar defensinas e mitilinas específicas nos hemócitos de *N. nodosus*. Infelizmente, a busca destas moléculas por abordagem molecular não teve sucesso, provavelmente devido ao fato dos iniciadores desenhados com base a seqüências gênicas de mexilhões disponíveis no GenBank, não serem os mais apropriados para pectinídeos. A busca destes PAM por abordagem molecular merece ser melhor investigada, e seu estudo está atualmente em progresso em nosso laboratório.

Paralelamente à busca de peptídeos antimicrobianos nos hemócitos de *N. nodosus*, a atividade antimicrobiana de sua hemolinfa (HT) foi também avaliada contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, incluindo vibrios marinhos. Contudo, os resultados destas análises foram curiosamente negativos, havendo apenas uma atividade pouco significativa contra *M. luteus* e *E. coli*. A ausência de atividade antimicrobiana na hemolinfa de *N. nodosus* poderia ser explicada pelos baixos níveis de PAM livres na hemolinfa, uma vez que se usou hemolinfa total e não apenas os hemócitos (lisado celular) que sabidamente produzem estas moléculas. Uma outra hipótese seria a inativação potencial dos PAM por proteases da hemolinfa.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos hemócitos de bivalves, durante a fagocitose ou após estimulação por agentes ativadores, é descrita como uma das reações imunológicas mais efetivas na destruição de microrganismos (Vargas-Albores e Barracco, 2001). Assim, a produção destes radicais pelos hemócitos, após estimulação, vem sendo largamente utilizada como parâmetro imunológico na avaliação da imunocompetência dos animais e sua condição de estresse (Volety e Chu, 1995; Chu et al., 1996; Wootton et al., 2003). A produção de ERO (ânion superóxido) pelos hemócitos de *N. nodosus*, após estimulação com zymosan (fragmentos de parede de leveduras, ricos em β -1,3-glicanas), mostrou uma fraca capacidade de indução nos juvenis em relação aos adultos, sugerindo que o sistema imunológico dos juvenis esteja ainda imaturo e não responsivo a agentes ativadores. Por outro lado, nas vieiras sexualmente maduras e prontas para a desova (grupo M), assim como nos animais recém-desovados (grupo D) a produção basal de

ERO foi muita alta (3,6 e 3,8x, respectivamente) em relação aos animais adultos (grupo A) e conseqüentemente sua indução pelo zymosan foi mínima (menos de 10%). Estes resultados parecem indicar que o período de maturação das gônadas e a desova acarretam uma situação de estresse aos animais que se expressa por uma alta produção basal de ERO, e, portanto, uma baixa capacidade de indução pelo zymosan. Situação semelhante foi descrita em poliquetas por Keller et al. (2004) que constatarem um aumento expressivo na produção basal de ERO, quando estes se encontravam prontos para a desova. Interessantemente, o tratamento de *N. nodosus* com uma dieta rica em astaxantina mostrou uma produção basal de ERO significativamente inferior nas vieiras sexualmente maduras e recém-desovadas do que nos animais correspondentes alimentados com a dieta padrão, e esta produção podia ser claramente ativada pelo zymosan. Estes resultados sugerem que a dieta rica no composto antioxidante astaxantina protege os animais da produção basal excessiva de ERO, que são moléculas altamente tóxicas inclusive para os tecidos da própria vieira.

A concentração de proteínas totais (CP) no plasma e na hemolinfa total dos diferentes grupos de *N. nodosus* mostrou um perfil semelhante ao dos hemogramas. Houve um aumento significativo da CP (2,9x) dos juvenis para os adultos, havendo um declínio evidente (1,7x) nos animais maduros sexualmente, mostrando mais uma vez que a maturação gonádica é um processo crítico para a vieira. Após a desova, houve uma tendência de recuperação dos níveis de CP do plasma e da hemolinfa total das vieiras. A dieta rica em astaxantina não resultou em nenhuma alteração significativa da CP nos animais tratados.

Como mencionado anteriormente, as lectinas plasmáticas são moléculas imunológicas, envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares específicos (no caso açúcares) presentes na superfície de microrganismos, causando sua aglutinação e facilitando eventualmente sua fagocitose pelos hemócitos. A modulação da expressão destas moléculas de reconhecimento poderia, assim, estar correlacionada ao estado de saúde dos animais e à presença de infecções. A hemolinfa (plasma) de *N. nodosus* foi capaz de aglutinar vários tipos de eritrócitos de mamíferos, mas os títulos aglutinantes não foram muito altos (título máximo = 32, para eritrócitos de cão e coelho). Esta atividade aglutinante mostrou-se específica para galactose e sialoconjugados, como já observado em outras espécies de bivalves (Suzuki e Mori, 1990; Wang et al., 2000; Minamikawa et al., 2004; Kim, et al., 2006; Wang et al., 2007). A reação de aglutinação mostrou-se, no entanto, fracamente dependente de cálcio, diferindo, das lectinas encontradas em outros bivalves, que na sua ampla maioria são moléculas cuja atividade é fortemente dependente de cálcio (Odo et al., 1995; Bulgacov et al., 2004; Wang et al., 2007). Estes resultados distintos sobre as lectinas de *N. nodosus* em relação a outros bivalves encorajam maiores estudos para melhor compreender suas características químicas e modo de ação no contexto imunológico das vieiras.

Com relação à variação do título aglutinante do plasma, nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa dos níveis de aglutinação nos diferentes grupos de *N. nodosus*, havendo, porém, uma tendência de diminuição nos animais maduros sexualmente e após desova, sugerindo novamente que a reprodução é um momento crítico para as vieiras. Mais uma vez, a dieta rica em astaxantina não teve influência na modulação da atividade aglutinante das vieiras.

A atividade da enzima fenoloxidase (PO) é também um parâmetro imunológico altamente utilizado para expressar as condições de saúde, principalmente em crustáceos cultivados (Barracco, 2004). Como mencionado anteriormente, a atividade desta enzima é usualmente desencadeada após clivagem proteolítica de sua pró-forma proPO por serino proteases endógenas, que por sua vez são especificamente induzidas por componentes da superfície de microrganismos, como as peptidoglicanas, lipopolissacarídeos (LPS) e β -1,3-glicanas de bactérias Gram positivas, negativas e fungos respectivamente (Barracco, 2004; Cerenius e Söderhäll, 2004). Nos bivalves, o sistema proPO foi muito menos estudado do que em crustáceos e insetos e os resultados disponíveis até o momento são ainda confusos e controversos. Além do mais, seu envolvimento no sistema imune de moluscos é ainda questionável. De fato, em nosso estudo, a proPO de *N. nodosus* surpreendentemente não foi ativada pela tripsina, nem por LPS e β -1,3-glicanas, como comumente ocorre nos crustáceos. Este fato foi também observado em outros bivalves, inclusive nos pectínídeos *Placopecten magellanicus* e *Argopecten irradians* (Deaton et al., 1999). Todavia, em *Perna viridis* foi evidenciada uma elevada atividade da PO na presença de tripsina, β -1,3-glicanas e LPS (Asokan et al., 1997), e posteriormente também em alguns outros bivalves, incluindo os pectínídeos *Argopecten ventricosus* e *Nodipecten subnodosus* (Luna-González et al., 2003). Por outro lado, detergentes como SDS e Triton, que usualmente induzem a atividade da PO em moluscos, não foram capazes de induzir a PO de *N. nodosus* de forma significativa. O melhor ativador da PO em nosso estudo foi o pH alcalino (9,0), que provavelmente provoca uma mudança conformacional da enzima levando à sua ativação. Resultados semelhantes foram também encontrados em várias outras espécies de bivalves analisadas em nosso laboratório (dados não publicados), sugerindo, assim, que a estrutura da PO de moluscos e seu mecanismo de ação possam ser distintos da PO de artrópodes, como também referido por Renwranz et al. (1996).

A atividade da PO, nos diferentes grupos de *N. nodosus*, mostrou um perfil distinto dos outros parâmetros imunológicos avaliados neste estudo. A atividade específica da PO dos juvenis foi significativamente mais elevada do que a dos adultos. Estes resultados são provavelmente decorrentes da baixa CP da hemolinfa dos juvenis, que resulta conseqüentemente numa alta atividade específica da PO. Nos outros grupos de animais não houve diferenças significativas na atividade da enzima após indução (pH 9,0). Cabe salientar, que nos animais desovados, a atividade basal da PO (pH fisiológico) se mostrou significativamente maior em relação aos adultos imaturos, indicando que grande parte da forma zimogênica (proPO) já estava transformada na forma ativa (PO), motivo pelo qual não foi possível induzir significativamente a atividade da enzima (pH alcalino), sugerindo, mais uma vez, que a maturação e a desova tenham provocado estresse nos reprodutores. Os grupos de vieiras tratados com a dieta rica no composto antioxidante astaxantina mostraram uma tendência de menor indução da PO (pH = 9,0) em relação aos respectivos grupos alimentados com a dieta padrão. Estes resultados mostraram-se semelhantes à produção de ERO, confirmando a função antioxidante da astaxantina.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o processo de indução à desova em laboratório, em especial a maturação gonádica, afeta de modo significativo o sistema imune dos adultos de *N. nodosus*, possivelmente, em decorrência do forte direcionamento dos recursos

energéticos para o tecido reprodutivo dos animais em detrimento dos outros tecidos. Este fato foi também observado por Jokela e Mutikainen (1995) no bivalve *Anodonta piscinalis*, onde a alocação de recursos energéticos para o tecido reprodutivo excede o investimento em tecido somático, proporcionando uma redução do crescimento deste bivalve e um conseqüente estresse durante este período, no qual, coincidentemente, ocorrem as maiores taxas de mortalidade desta espécie. Brokordt et al. (2000) também evidenciaram uma redução dos índices bioquímicos e da capacidade oxidativa do músculo adutor da vieira *Chlamys islandica* após o período reprodutivo.

A suplementação da dieta com o carotenóide astaxantina, durante o processo de maturação gonádica de *N. nodosus* influenciou apenas os parâmetros que envolvem as reações oxidativas, como a produção de ERO e a ativação do sistema proPO, assim como esperado pelo seu poder antioxidante. Por outro lado, cabe salientar, que a dieta rica em astaxantina resultou num aumento significativo da desova dos reprodutores e da sobrevivência das larvas (43,8 %) contribuindo sobremaneira para o sucesso de seu cultivo (dados não mostrados). Estes resultados, que não parecem estar diretamente relacionados com uma maior resistência imunológica são promissores e merecem ser melhor compreendidos.

5. Conclusões

O pectinídeo *Nodipecten nodosus* apresentou duas populações de hemócitos na sua hemolinfa: hemócitos hialinos (HH) e hemócitos granulares (HG). A presença de HG, tipo celular predominante, não é uma constante dentre os pectinídeos, e não havia sido encontrado inicialmente nesta espécie de vieira. Nos grânulos dos HG foram detectados peptídeos antimicrobianos semelhantes às mitilinas e defensinas de mexilhões, no entanto, não foi observada uma atividade antimicrobiana na hemolinfa contra bactérias Gram positivas, negativas e vibrios marinhos. Os hemócitos desta espécie mostraram-se capazes de fagocitar e produzir espécies ativas de oxigênio (moléculas microbicidas potentes) após estimulação.

Uma atividade fenoxidásica foi encontrada na hemolinfa das vieiras, entretanto, esta atividade não foi induzida por serino-proteases e componentes da superfície de microorganismos, como usualmente relatado em artrópodes, sendo o pH alcalino o melhor ativador da enzima.

Lectinas com especificidade para galactose e sialoconjugados foram detectadas no plasma de *N. nodosus*. Estas lectinas mostraram-se parcialmente dependentes de cálcio, diferentemente de outros bivalves.

Em *N. nodosus*, a passagem do estágio juvenil para o adulto parece ser acompanhada por um amadurecimento do seu sistema imunológico e um concomitante aumento do potencial de defesa do organismo, havendo em seguida uma evidente depleção deste sistema por ocasião da maturação sexual e uma tendência de recuperação após a desova.

A dieta rica no carotenóide astaxantina durante a fase reprodutiva levou a uma diminuição das reações imuno-oxidativas, como a produção de ERO e a atividade da PO, confirmando assim o potencial antioxidante deste composto e reforçando sua contribuição para um melhor desempenho reprodutivo destes animais.

6. Referências

- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish Shellf. Immunol.* 16, 527-537.
- Anderson, R.S., 1996. Production of oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In: Söderhall, S., Iwanaga, S., Vasta, G.R. (Eds), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, pp. 109-129.
- Asokan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 1-12.
- Auffret, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fisher. Soc. Spec. Publ.* 18, 169-177.
- Barracco, M.A. 2004. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos, In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. (Eds), *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Varela, São Paulo, pp. 49-72.
- Barracco, M.A., Medeiros, I.D., Moreira, F.M., 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna Perna*. *Fish Shellf. Immunol.* 9, 387-404.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T., Liaaen-Jensen, S., 1992. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. *Aquaculture.* 108, 333-346.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Brokordt, K.B., Himmelman, J.H., Guderley, H.E., 2000. Effect of reproduction on escape responses and muscle metabolic capacities in the scallop *Chlamys islandica* Müller 1776. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 251, 205-225.
- Bulgakov, A.A., Park, K-I., Choi, K-S., Lim, H-K., Cho, M., 2004. Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish Shellf. Immunol.* 16, 487-499.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 72-82.
- Charlet, M.S., Chernysh, S., Phillipe, H., Hetru, C., Hoffmann, J., Bulet, P., 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271, 21808-21813.
- Chu, F-L.E., Hale, R.C., Volety, A., Constantin, G., 1996. Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster. *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 42, 1-4.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutricion of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture.* 235, 513-551.
- Deaton, L.D., Lordan, P.J., Dankert, J.R., 1999. Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. *J. Shellf. Res.* 18, 223-226.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J-M., Dorsselaer, A., Bachère, E., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.* 266, 335-346.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and release after microbial challenge. *J. Cell. Sci.* 113, 461-469.
- Engelmann, P., Cooper, E.L., Németh, P., 2005. Anticipating innate immunity without a Toll. *Mol. Immunol.* 42, 931-942.
- FAO, 2004. *The State of World's Fisheries and Aquaculture*. Publishing Management Service, Rome, 146 pp.
- Farías-Molina, A., 2001. Nutrición en moluscos Pectínidos. In: Maeda-Martínez, A.N. (Ed), *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Limusa, La Paz, pp. 89-104.

- Freitas, C.A., 2001. Formação da gônada e Índice Gonádico em juvenis da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae) cultivados em diferentes profundidades. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aqüicultura), Departamento de Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 43 p.
- Fu, J.H., Zhang, W.B., Mai, K.S., Feng, X.N., Xu, W., Liufu, Z.G., Tan, B.P., 2006. Effects of dietary vitamin A on antioxidant responses of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Acta Oceanol. Sin.* 25, 141-150.
- Gonzalez M., Arenas, G., 2002. Characterization of the immune response of the north scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). *Cien. Mar.* 28, 247-255.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., Lorgeril, J., Romestand, B., Bachère, E., 2007. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 332-339.
- Gu, W.L., An, G.H., Johnson, E.A., 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 114–117.
- Hancock, R.E.W., Brown, K.L., Mookherjee, N., 2006. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunology.* 211, 315-322.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., 2005. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harm. Algae.* 4, 187–199.
- Henry, M., Auffret, M., Boucaud-Camou, E., 1990. Aspects ultrastructuraux et fonctionnels des hemocytes de quatre familles de Bivalves (Ostreidae, Veneridae, Mytilidae, Pectinidae). *Haliotis.* 10, 195–196.
- Hubert, F., Noël, T., Roch, P., 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 240, 302-306.
- Johnson, E.A., Schroeder, W.A., 1995. Microbial carotenoids. In: Fiechter, A. (Ed), *Advances Biochemical Engineering and Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 119–178.
- Jokela, J., Mutikainen, P., 1995. Phenotypic plasticity and priority rules for energy allocation in a freshwater clam: a field experiment. *Oecologia.* 104, 122-132.
- Kawakami, T., Tsushima, M., Katabami, Y., Mine, M., Ishida, A., Matsuno, T., 1998. Effect of b-carotene, b-echinone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226, 165–174.
- Keller, M., Sommer, A.M., Pörtner, H.O., Abele, D., 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J. Exp. Biol.* 207, 2529-2538.
- Kim, Y.M., Park, K-I., Choi, K-S., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Cho, M., 2006. Lectin from the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Is Induced upon Infection with the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni*. *J. Biol. Chem.* 37, 26854-26864.
- Lambert, C., Nicolas, J.L., 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves – *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *J. Invert. Pathol.* 71, 53-63.
- Liu, S., Jiang, X., Hu, X., Gong, J., Hwang, H., Mai, K., 2004. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two Scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). *Aquacult. Res.* 35, 678-682.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shelf. Immunol.* 15, 275–282.
- Manzoni, G.C., 1994. Aspectos da Biologia de *Nodipecten nodosus*, (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia), nos arredores da ilha do Arvoredo (Santa Catarina - Brasil), com vistas a sua utilização na aqüicultura. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aqüicultura), Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 98 pp.

- Manzoni, G.C., Rupp, G.S., 1993. Estudo da Biologia Reprodutiva e Viabilidade de Cultivo de *Lyropecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Pectinidae) na Ilha do Arvoredo – SC. UFSC, Florianópolis, 35 pp.
- Marques, M.R.F., Barracco, M.A., 2000. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*. 191, 23-44.
- Minamikawa, M., Hine, M., Russel, S., Huber, P., Duignan, P., Lumsden, J.S., 2004. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. *Fish Shelf. Immunol.* 17, 463-476.
- Mitta, G., Hubert, F., Nöel, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 265, 71-78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112, 4233-4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P., 2000a. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defence. *J. Biol. Chem.* 275, 12954-12962.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrinda, E.A., Boudry, P., Roch, P., 2000b. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 381-393.
- Mortensen, S.H., Glette, J., 1996. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. *Fish Shellf. Immunol.* 6, 111-121.
- Muta, T., 2006. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1 → 3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. *Curr. Pharm. Des.* 32, 4155-4161.
- Naguib, Y.M.A., 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1150-1154.
- Nappi, A.J., Vass, E., 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. *Pigm. Cell Res.* 6, 117-126.
- Nilsen, I.W., Overbo, K., Sandsdalen, E., Sandaker, E., Sletten, K., Myrnes, B., 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS.* 464, 153-158.
- Odo, S., Kamino, K., Kanai, S., Maruyama, T., Harayama, S., 1995. Biochemical-characterization of a Ca^{2+} -dependent lectin from the hemolymph of a photosymbiotic marine bivalve, *Tridacna derasa* (Roding). *J. Biochem.* 117, 965-973.
- Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invert. Patol.* 64, 33-38.
- Rengel, D., Diez-Navajas, A., Serna-Rico, A., Veiga, P., Muga, A., Milicua, J.C.G., 2000. Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1463, 179-187.
- Renwrantz L., Schmalmack, W., Redel, R., Friebel, B., Schneeweib, H., 1996. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. *J. Comp. Physiol.* 165, 647-658.
- Rupp, G.S.; Poli, C.R., 1994. Spat production of the sea scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758), in the hatchery: initial studies in Brazil. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2, 91-96.
- Rupp, G. S.; Vélez, A.; De Bem, M.; and Poli, C. R., 1997. Effect of temperature on conditioning and spawning of the tropical scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). In: Félix-Pico, E. F. (Ed), *Book of Abstracts of the 11th International Pectinid Workshop*. México, pp.132-133.
- Rupp, G.S., Bem, M.M., 2003. Cultivo de vieiras. In: Poli, C.R., Poli, A.T.B., Andreatta, E., Beltrame, E. (Eds), *Aqüicultura: Experiências Brasileiras*, UFSC, Florianópolis, pp. 289-308.

- Rupp, G.S., Parson, G.J., 2006. Scallop aquaculture and fisheries in Brazil. In: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (Eds), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Oxford, pp. 1225-1245.
- Schulze, A.D., Alabi, A.O., Tattersall-Sheldrake, A.R., Miller, K.M., 2006. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*. 256, 50-73.
- Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta*. 797, 99-104.
- Storebakken, T., No, H.K., 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. 100, 209-229.
- Suzuki, T., Mori, K., 1990. Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: A possible non-self recognition system. *Dev. Comp. Immunol.* 14, 161-173.
- Tincu, J.A., Taylor, S.W., 2004. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3645-3654.
- Tunkijjanukij, S., Giaever, H., Chin, C.C.Q., Olafsen, J.A., 1998. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 119, 705-713.
- Tunkijjanukij, S., Mikkelsen, H.V., Olafsen, J.A., 1997. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 117, 273-286.
- Vanderberghe, J., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Swings, J., 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*. 219, 9-20.
- Vargas-Albores, F., Barracco, M.A., 2001. 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*. Limusa, La Paz, pp.127-140.
- Volety, A.K., Chu, F-L.E., 1995. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 135-142.
- Wang, H., Gao, J., Ng, T.B., 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Commun.* 275, 810-816.
- Wang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., Xu, W., 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Mol. Immunol.* 44, 722-731.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A, Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A., 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve mollusks. *Aquat. Toxicol.* 65, 13-25.
- Xing, J., Zhan, W., 2005. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). *Fish Shelf. Immunol.* 19, 17-25.
- Xing, J., Zhan, W., Zhou, L., 2002. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop (*Chlamys farreri*). *Fish Shelf. Immunol.* 13, 271-278.
- Zhang, W., Wu, X., Wang, M., 2006. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. *Aquaculture*. 251, 19-32.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 16, p. 527-537, 2004.
- ANDERSON, R. S. Production of oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In: SÖDERHALL, S.; IWANAGA, S.; VASTA, G. R. **New directions in invertebrate immunology**. Fair Haven: SOS Publications, 1996. p. 109-129.
- ARUMUGAM, M.; ROMESTAND, B.; TORREILLES J.; ROCH, P. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 79, p. 513-519, 2000.
- ASOKAN, R.; ARUMUGAM, M.; MULLAINADHAN, P. Activation of prophenoloxidase in the plasma haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 21, p. 1-12, 1997.
- ASOKAN, R.; ARUMUGAM, M.; MULLAINADHAN, P. Functional analysis of plasma prophenoloxidase system in the marine mussel *Perna viridis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 753-762, 1998.
-]AUFFRET, M. Bivalve hemocyte morphology. **Am. Fisher. Soc. Spec. Publ.**, v. 18, p. 169-177, 1988.
- AVENDAÑO, R. E; RIQUELME, C. E.. Establishments of mixidculture probiotics and microalgae as food for bivalve larval. **Aquacult. Res.**, v. 30, p. 893-900, 1999.
- BEM, M. M. 1999. **Efeitos da adição de antibióticos no cultivo de larvas de *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA: PECTINIDAE)**. 110 f. Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; LIAAEN-JENSEN, S. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. **Aquaculture**, v. 108, p. 333-346, 1992.
- BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura: uma visão sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrados de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128p.
- BOWER; S. M.; BLACKBOURN, J.; MEYER, G. R. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Can. J. Zool.**, v. 76, p. 954-959, 1998.
- BRAND, A. R. Scallop ecology: distribution and behavior. In: SHUMWAY, S. E.; PARSONS, G. J. **Scallops: biology, ecology and aquaculture**. Oxford: Elsevier, 2006. p. 123-211.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 169-184, 2004.
- BULGAKOV, A. A.; PARK, K-I.; CHOI, K-S.; LIM, H-K.; CHO, M. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 16, p. 487-499, 2004.
- CAERS, M.; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. **Aquaculture**, v. 170, p. 307-322, 1999.
- CAMUS, L.; JONES, M. B.; BØRSETH, J. F.; GRØSVIK, B. E.; REGOLI, F.; DEPLEDGE, M. H. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 425-430, 2002.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase system in invertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 72-82, 2004.
- CHARLET, M. S.; CHERNYSH, S.; PHILLIPE, H.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.; BULET, P. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **J. Biol. Chem.**, v.271, p. 21808-21813, 1996.
- CHEW, B. P. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 59, p. 103- 114, 1996.

- CHEW, B. P.; PARK, J. S. Carotenoid Action on the Immune Response. **J. Nutr.**, v. 134, p. 257S–261S, 2004.
- COLES, J. A.; PIPE, R. K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the bivalve mollusks. **J. Shellf. Res.**, v. 4, p. 337-352, 1994.
- CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutricion of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, p. 513-551, 2004.
- DEATON, L. D.; LORDAN, P. J.; DANKERT, J. R. Phenoloxidase activity in the hemolymph f bivalve mollusks. **J. Shellf. Res.**, v. 18, p. 223-226, 1999.
- DELAUNAY, F.; MARTY, Y.; MOAL, J.; SAMAIN, J. F. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 173, p. 163–179, 1993.
- DEMING, D. M.; ERDMAN, J. W. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. **Pure Appl. Chem.**, v. 71, P. 2213-2223, 1999.
- ENGELMANN, P.; COOPER, E. L.; NÉMETH, P. Anticipating innate immunity without a Toll. **Mol. Immunol.**, v. 42, p. 931-942, 2005.
- FAO. **The State of World-s Fisheries and Aquaculture 2004**. FAO Information Division. Rome, Italy, 2004. Disponível em: http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm. Acesso em 20 de jul. de 2005.
- FARÍAS-MOLINA, A. Nutrición en moluscos pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ, A. N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura**. La Paz: Limusa, 2001. p. 89-104.
- FREITAS, C. A. **Formação da gônada e Índice Gonádico em juvenis da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae) cultivados em diferentes profundidades**. 2001. 43 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FU, J. H.; ZHANG, W. B.; MAI, K. S.; FENG, X. N.; XU, W.; LIUFU, Z. G.; TAN, B. P. Effects of dietary vitamin A on antioxidant responses of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. **Acta Oceanol. Sin.**, v. 25, p. 141-150, 2006.
- GONZALEZ M.; ARENAS, G. Characterization of the immune response of the north scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). **Cien. Mar.**, v. 28, p. 247-255, 2002.
- GU, W. L.; AN, G. H.; JOHNSON, E. A. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p. 114–117, 1997.
- HANCOCK, R. E. W.; BROWN, K. L.; MOOKHERJEE, N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. **Immunology**, v. 211, p. 315-322, 2006.
- HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H. Time-dependent changes in emocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. **Harm. Algae**, v. 4, p. 187–199, 2005.
- HENRY, M.; AUFFRET, M.; BOUCAUD-CAMOU, E. Aspects ultrastructuraux et fonctionnels des hemocytes de quatre familles de Bivalves (Ostreidae, Veneridae, Mytilidae, Pectinidae). **Haliotis**, v. 10, p. 195–196, 1990.
- HINE, P. M. The inter-relationship of bivalve haemocytes Review. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 9, p. 367-385, 1999.
- HUBERT, F.; NÖEL, T.; ROCH, P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Eur. J. Biochem.**, v. 240, p. 302-306, 1996.
- JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. In: FIECHTER, A. **Advances Biochemical Engineering and Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 119– 178.
- KAWAKAMI, T.; TSUSHIMA, M.; KATABAMI, Y.; MINE, M.; ISHIDA, A.; MATSUNO, T. Effect of b-carotene, b-echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 226, p. 165–174, 1998.
- KOBAYASHI, M.; SAKAMOTO, Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green algae *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 265–269, 1999.

- LAMBERT, C.; NICOLAS, J. L. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves – *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. **J. Invert. Pathol.**, v. 71, p. 53-63, 1998.
- LIU, S.; JIANG, X.; HU, X.; GONG, J.; HWANG, H.; MAI, K. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two Scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). **Aquacult. Res.**, v. 35, p. 678-682, 2004.
- LUNA-GONZÁLEZ, A.; MAEDA-MARTÍNEZ, A. N.; VARGAS-ALBORES, F.; ASCENCIO-VALLE, F.; ROBLES-MUNGARAY, M. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 15, p. 275–282, 2003.
- MANZONI, G. C. **Aspectos da Biologia de *Nodipecten nodosus*, (Linnaeus, 1758) (MOLLUSCA : BIVALVIA), nos arredores da ilha do Arvoredo (Santa Catarina - Brasil), com vistas a sua utilização na aquicultura.** 1994. 98 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aquicultura) - Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MANZONI, G. C.; RUPP, G. S. **Estudo da biologia reprodutiva e viabilidade de cultivo de *Lyropecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Pectinidae) na Ilha do Arvoredo – SC.** Florianópolis: UFSC, 1993. 35 p. (Relatório final, Projeto).
- MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 23-44, 2000.
- MERCADO, L. A.; MARSHALL, S. H.; ARENAS, G. M. Detection of phenoloxidase (PO) in hemocytes of the clam *Venus antiqua*. **Malacologia**, v. 44, p. 17-22, 2002.
- MEYERS, P. S. Developments in World aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p.1069-1076, 1994.
- MINAMIKAWA, M.; HINE, M.; RUSSEL, S.; HUBER, P.; DUIGNAN, P.; LUMSDEN, J. S. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 17, p. 463-476, 2004.
- MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; ROCH, P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. **J. Cell Sci.**, v. 486, p. 185-190, 2000.
- MORTENSEN, S. H.; GLETTE, J. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 6, p. 111–121, 1996.
- MUTA, T. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1 -> 3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. **Curr. Pharm. Des.**, v. 32, p. 4155-4161, 2006.
- NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 1150–1154, 2000.
- NICOLAS, J. L.; CORRE, S.; GAUTHIER, G.; ROBERT, R.; ANSQUER, D. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. **Dis. Aquat. Org.**, v. 27, p. 67-76, 1996.
- NILSEN, I. W.; OVERBO, K.; SANDSDALEN, E.; SANDAKER, E.; SLETTEN, K.; MYRNES, B. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. **FEBS**, v. 464, p. 153-158, 1999.
- ODO, S.; KAMINO, K.; KANAI, S.; MARUYAMA, T.; HARAYAMA, S. Biochemical-characterization of a Ca²⁺-dependent lectin from the hemolymph of a photosymbiotic marine bivalve, *Tridacna derasa* (Roding). **J. Biochem.**, v. 117, p. 965-973, 1995.
- PEÑA, J. B. Taxonomía, Morfología, distribución y hábitat de los pectínidos iberoamericanos. In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura.** La Paz: Limusa, 2001. p.1-23.
- PIPE, R. K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. **Histochem.**, v. 22, p. 595–603, 1990.
- PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 16, p. 111–122, 1992.

- RACOTTA, I. S.; RAMIREZ, J. L.; AVILA, S.; IBARRA, A. M. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. **Aquaculture**, v. 163, p. 111-122, 1998.
- RENGEL, D.; DIEZ-NAVAJAS, A.; SERNA-RICO, A.; VEIGA, P.; MUGA, A.; MILICUA, J. C. G. Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1463, p.179-187, 2000.
- RENWRANTZ L.; SCHMALMACK, W.; REDEL, R.; FRIEBEL, B.; SCHNEEWEIB, H. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 165, p. 647-658, 1996.
- RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2 ed. Rio Grande: FURG, 1994. 328 p.
- ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. **Aquaculture**, v. 172, p. 125-145, 1999.
- RUPP, G. S.; BEM, M. M. Cultivo de vieiras. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. **Aqüicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: UFSC, 2003. p. 289-308.
- RUPP, G. S.; PARSON, G. J. Scallop aquaculture and fisheries in Brazil. In: SHUMWAY, S. E.; PARSONS, G. J. **Scallops: biology, ecology and aquaculture**. Oxford: Elsevier, 2006, p. 1225-1245.
- SILINA, A. V. Mortality of late juvenile and adult stage of the *Mizuhopecten yessoensis* (Jay). **Aquaculture**, v. 141, p. 97-105, 1996.
- SMITH, J. T. **Cenozoic giant pectinids from California and Tertiary Caribbean province: *Lyropecten*, "*Macrochlamis*", *Vertipecten*, and *Nodipecten* species**. Washington: United States Government, 1991. 136 p.
- SOUDANT P.; RYCKEGHEM, K. V.; MARTY, Y.; MOAL, J.; SAMAIN, J. F.; SORGELOOS, P. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. **Comp. Biochem. Physiol. Part B.**, v. 123, p. 199-222, 1999.
- SOUDANT P.; SANLES, M. V.; QUERE C.; LE COZ, J. R.; RYCKEGHEM, K. V.; MARTY, Y.; MOAL, J.; SAMAIN, J. F.; SORGELOOS, P. The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v. 184, p. 315-326, 2000.
- STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, p. 246-248, 1981.
- STOREBAKKEN, T.; NO, H. K. Pigmentation of rainbow trout. **Aquaculture**, v. 100, p. 209-229, 1992.
- SUZUKI, T.; MORI, K. Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: A possible non-self recognition system. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 14, p. 161-173, 1990.
- TINCU, J. A.; TAYLOR, S. W. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 3645-3654, 2004.
- TUNKIJJANUKIJ, S.; GIAEVER, H.; CHIN, C.C.Q.; OLAFSEN, J.A. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. **Comp. Biochem. Physiol. Part B.**, v. 119, p. 705-713, 1998.
- TUNKIJJANUKIJ, S.; MIKKELSEN, H. V.; OLAFSEN, J. A. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 117, p. 273-286, 1997.
- URIARTE, I.; FARÍAS, A.; HERNANDEZ, J.; SCHÄFER, C.; SORGELOOS, P. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. **Aquaculture**, v. 230, p. 349-357, 2004.
- VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura**. La Paz: Limusa, 2001. p.127-140.
- VOLETY, A. K.; CHU, F. L. E. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 19, p. 135-142, 1995.

- WANG, H.; GAO, J.; NG, T.B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochem. Biophys. Commun.**, v. 275, p. 810-816, 2000.
- WANG, H.; SONG, L.; LI, C.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; NI, D.; XU, W. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 722-731, 2007.
- WOOTTON, E.C.; DYRYNDA, E. A.; PIPE, R. K.; RATCLIFFE, N. A. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve mollusks. **Aquat. Toxicol.**, v. 65, p 13-25, 2003.
- XING, J.; ZHAN, W. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). **Fish Shelf. Immunol.**, v. 19, p. 17-25, 2005.
- XING, J.; ZHAN, W.; ZHOU, L. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop (*Chlamys farreri*). **Fish Shelf. Immunol.**, v. 13, p. 271-278, 2002.
- YAKOVLEVA, N. V.; SAMOILOVICH, M. P.; GORBUSHIN, A. M. The Diversity of Strategies of Defense from Pathogens in Molluscs. **J. Evol. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 358-367, 2001.
- ZHANG, W.; WU, X.; WANG, M. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. **Aquaculture**, v. 251, p. 19-32, 2006.