

DANIELLE FERRAZ MELLO

DETECÇÃO DE POTENCIAIS PATÓGENOS DE OSTRAS DE
CULTIVO EM SANTA CATARINA E INVESTIGAÇÃO DE
MECANISMOS DE DEFESA IMUNE E ANTIOXIDANTE

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Doutor em Bioquímica.
Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

FLORIANÓPOLIS
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mello, Danielle Ferraz

Detecção de potenciais patógenos de ostras de cultivo em Santa Catarina e investigação de mecanismos de defesa imune e antioxidante / Danielle Ferraz Mello ; orientador, Alcir Luiz Dafre - Florianópolis, SC, 2016.

141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

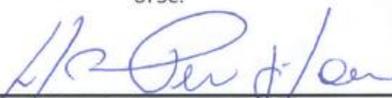
1. Bioquímica. 2. Patógenos de ostras. 3. Imunoparâmetros. 4. Sistema antioxidante. 5. Glutathione. I. Dafre, Alcir Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Detecção de potenciais patógenos de ostras de cultivo em Santa Catarina e investigação de mecanismos de defesa imune e antioxidante”

Por

Danielle Ferraz Mello

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (05/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

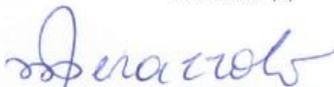


Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



Dr(a) Alcir Luiz Dáfre (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Luciane Maria Perazzolo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Afonso Celso Dias Bainy (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Juliano Zanette (Universidade Federal de do Rio Grande)



Dr(a) Eduardo Cargnin Ferreira (Instituto Federal de Educação Tecnológica de Santa Catarina)

Florianópolis, 02 de março de 2016.

*Dedico este trabalho à minha família, ao meu marido e a Deus.
Quando se tem pessoas ao seu redor que te amam tanto e desejam
muito seu bem, qualquer desafio da vida se torna muito mais leve.*

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Em especial, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre, por ser um orientador extremamente presente e acessível durante todo o meu doutorado. Por sempre zelar pela qualidade das pesquisas e pela importância de compreendermos os métodos que estamos aplicando. Pelos momentos de descontração, os quais sempre incentivou, inclusive patrocinando muitos deles! Principalmente, gostaria de agradecer pela amizade, por estar sempre preocupado não apenas com a pesquisa de seus alunos, mas também com o bem-estar dos mesmos.

À minha ex-orientadora de mestrado e TCC, Profa. Dra. Margherita Anna Barracco, a qual me acolheu em seu laboratório já no meu segundo ano de graduação e, desde então, tem contribuído de forma significativa para a minha formação como pesquisadora, incentivando sempre princípios de ética e de responsabilidade e despertando em mim cada vez mais o amor e curiosidade pelo estudo dos sistemas biológicos. Tudo isso acompanhado de muito carinho e amizade, a qual quero cultivar para sempre.

A todos os amigos do Laboratório de Defesas Celulares que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído. Às muitas risadas e companheirismo que para mim são as características mais marcantes deste grupo e que eu vou levar sempre em minha memória! Realmente tive muita sorte de fazer parte de um grupo tão agradável de se conviver. Em especial gostaria de agradecer à Naissa, pela sua amizade e constante parceria nos experimentos. E a todos os alunos de iniciação científica que, mesmo que às vezes por curtos períodos, contribuíram para a realização deste trabalho: Miriam, Gabriel, Myrna, Leandro, Kelvis, Fernando, Daniela e Vanessa.

À Profa. Dra. Maria Risoleta Freire Marques e sua aluna Cecília pelo fornecimento da maioria dos víbrios utilizados neste estudo e pelas dicas de como cultivá-los.

Ao Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa também pelo fornecimento de uma das cepas de víbrio, e por estar sempre disposto a sanar minhas dúvidas, principalmente de microbiologia, e pela oportunidade de colaboração em alguns de seus projetos.

Ao Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy por ceder uma boa parte do seu freezer -80 °C para armazenamento das inúmeras (!!)- amostras de tecidos de ostras coletados para o Estudo 1.

Atoda equipe “*Mécanismes d’Interaction et d’Adaptation en Milieu Marin*”, da Universidade de Montpellier II, França, a qual me acolheu super bem durante o meu doutorado sanduíche, me apoiando sempre que necessário, mesmo em meio à barreira da língua estrangeira. Em especial à Dra. Caroline Montagnani pela sua orientação e também pelo fornecimento das amostras de DNA que serviram como controle positivo para a detecção dos patógenos do Estudo 1.

À UFSC pela bolsa CAPES fornecida durante o doutorado no Brasil e pela bolsa CAPES-PDSE fornecida durante o meu doutorado sanduíche. Ao CNPq pelo financiamento de boa parte das pesquisas relacionadas a esse trabalho através do edital CNPq/MPA -Nº 42/2012 (Processo Nº 406426/2012-0) e do edital MCTI/CNPQ/Universal Nº 14/2014 (Processo Nº 462333/2014-0).

A todos os meus queridos amigos que contribuíram cada um de forma única e especial durante esse período, pelos vários momentos de alegria e também pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À minha querida e amada família, por todo amor e carinho que recebo de vocês todos os dias, mesmo à distância. Aos meus pais, Sergio e Mirian, que sempre me incentivaram e me apoiaram imensamente... nada disto teria sido possível se não fosse por vocês!! À minha querida irmã Bianca, minha amiga e confidente, com quem eu sempre posso contar não importa a circunstância. À minha querida avó Aglais, que sempre com muito carinho me incentivou e ajudou a financiar meus estudos, nunca duvidando do meu potencial. Ao meu querido e falecido avô Daniel, o qual sempre incentivou o meu crescimento tanto pessoal e espiritual quanto intelectual. Nunca me esquecerei das primeiras frases que ouvia todas as vezes que ia visitá-lo desde pequena: “Já tem 2 m de altura? Já está na faculdade? Já virou doutora?”. Bom vôzinho, os 2 m de altura passaram longe, mas o título de doutora está agora bem perto!

Ao meu amadomado Dr. Rafael Trevisan por todos esses anos que esteve ao meu lado desde o início da Universidade, continuamente incentivando a minha carreira científica e me apoiando quando necessário. Esteve comigo em experimentos durante as madrugadas, finais de semana, feriados... trazendo sempre consigo sua disposição e bom humor! Agradeço, particularmente, sua paciência e parceria nos momentos finais deste doutorado, ficando acordado várias madrugadas comigo nem que fosse apenas para me fazer companhia!! E, principalmente, por me fazer muito feliz ao seu lado!!

A Deus, Jesus e o Espírito Santo, que diariamente me guiam e me sensibilizam para tentar ser uma pessoa melhor para mim mesma e para os outros ao meu redor, desafiando meu comodismo, meu egocentrismo e trazendo sentido e felicidade para o meu viver.

RESUMO

Ostras são organismos de ampla relevância econômica e ecológica. Contudo, mortalidades massivas de ostras têm aumentado em frequência e distribuição geográfica ao redor do mundo. Desta forma, estudos básicos a respeito da biologia desses animais, incluindo seus sistemas de defesa, são de fundamental importância. O presente trabalho investigou a presença de patógenos de bivalves em ostras cultivadas em Santa Catarina, os quais têm sido associados a mortalidades de ostras em outros países (Estudo 1). Além disso, buscou-se compreender melhor a respeito da relação entre os sistemas antioxidante e imune de ostras (Estudos 2 e 3). No Estudo 1, ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* e nativas *C. gasar* (= *C. brasiliana*) foram coletadas ao longo da costa de Santa Catarina e avaliadas quanto à presença do vírus Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) e das bactérias *Vibrio aestuarianus* e *V. splendidus*. Análises moleculares revelaram amostras positivas para *V. splendidus* (15 %) e OsHV-1 (28 %), sendo confirmadas por análises de sequenciamento. Este foi o primeiro trabalho demonstrando a presença de bactérias e vírus potencialmente patogênicos em ostras na costa brasileira, servindo de alerta para que medidas preventivas sejam adotadas para evitar o surgimento de mortalidades massivas de ostras no país. No Estudo 2, hemócitos de ostras *C. gigas* foram expostos ao agente eletrofílico 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). O CDNB não afetou a viabilidade mitocondrial, entretanto, diminuiu a estabilidade da membrana lisossomal dos hemócitos ($\geq 12,5 \mu\text{M}$). O CDNB causou um forte distúrbio no sistema antioxidante, promovendo depleção da glutatona ($\geq 0,1 \mu\text{M}$) e inibição das enzimas glutatona redutase (2,5 e 50 μM) e tioredoxina redutase (50 μM). Importantes funções desempenhadas pelos hemócitos (adesão, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio após imunoestimulação) foram comprometidas somente por 50 μM de CDNB. Os resultados indicam que a depleção total de glutatona não afeta a imunocompetência dos hemócitos, porém ocorre mediante uma inibição adicional de tiol redutases. No Estudo 3, a importância da glutatona para o sistema imune das ostras foi avaliada utilizando-se butionina sulfoximina (BSO), inibidor da síntese de glutatona. Ostras *C. gigas* foram expostas via intramuscular ao BSO (15 $\mu\text{mol/animal}$) por 1, 2 3 ou 6 dias, sendo observados menores níveis de glutatona (21-46 %) nas brânquias, glândula digestiva e hemócitos. O tratamento de 3 dias não afetou o hemograma das ostras, nem a viabilidade e capacidade de adesão e fagocitose dos hemócitos. Contudo, aumentou significativamente a

susceptibilidade das ostras ao patógeno *V. anguillarum* (33 %), e de forma marginalmente significativa às espécies *V. alginolyticus* e *V. harveyi*. A depleção parcial da glutathione também aumentou a susceptibilidade das ostras ao peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de cumeno. Os Estudos 2 e 3 sugerem que a glutathione não é indispensável para a função dos hemócitos, porém, quando outros componentes do sistema antioxidante são afetados, ou quando um segundo fator de estresse é aplicado, a homeostase destas células ou do organismo é comprometida. De forma geral, estes estudos básicos abrem caminho para vários outros nas áreas de aquicultura e ecotoxicologia, e contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvendo respostas imunes e antioxidantes de bivalves.

Palavras-chave: patógenos de bivalves. *Vibrio*. OsHV-1. hemócitos. glutathione. enzimas antioxidantes. imunoparâmetros.

ABSTRACT

Oysters are organisms that play important role economically and for the natural ecosystems. However, oyster massive mortalities have increased in intensity and geographic distribution worldwide. Therefore, studies aiming basic knowledge regarding the biology of oysters are pivotal, especially regarding their defense mechanisms. Thus, the aim of this study was to investigate the presence of oyster pathogens in Santa Catarina, Brazil, which have been associated to oyster massive mortalities in other countries (study 1). Moreover, another aim was to contribute to basic knowledge regarding the interrelationship of the immune and antioxidant system in oysters (studies 2 and 3). For the 1st study, Pacific oysters *Crassostrea gigas* and native oysters *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) were collected throughout the coast of Santa Catarina, and the presence of the virus Ostreid herpesvirus (OsHV-1), and the bacteria *Vibrio aestuarianus* and *V. splendidus* were evaluated. PCR analyses revealed positive samples for *V. splendidus* (15 %) and OsHV-1 (28 %), which was confirmed by sequencing analyses. This was the first study to investigate viral and bacterial pathogens to oysters in Brazil, and enlightens the need of preventive measures to be undertaken in order to avoid oyster massive mortalities in Santa Catarina. For the 2nd study, *C. gigas* hemocytes were *in vitro* exposed to the electrophilic agent 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). CDNB did not affect hemocyte mitochondrial viability, however decreased lysosomal membrane stability ($\geq 12.5 \mu\text{M}$). CDNB strongly affected hemocyte antioxidant system by depleting glutathione ($\geq 0.1 \mu\text{M}$) and by decreasing the activity of the enzymes glutathione reductase (2.5 and 50 μM) and thioredoxin reductase (50 μM). Hemocyte function (adhesion, phagocytosis, and reactive oxygen species production upon immunostimulation) were jeopardized only with CDNB 50 μM . These results revealed that total glutathione depletion does not affect hemocyte immunocompetence, however this may occur upon inhibition of thiol reductases. For the 3rd study, the importance of glutathione to the immune system of oysters was investigated by using butionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of the glutathione synthesis. Oysters *C. gigas* were exposed to BSO through intramuscular injections (15 $\mu\text{mol/animal/day}$) for 1, 2, 3 or 6 days, which promoted reduced glutathione levels (21-46 %) in the gills, digestive gland and hemocytes. The injection protocol of 3 days did not affect oyster hemogram, hemocyte viability, adhesion and phagocytosis. Nevertheless, it significantly increased oyster susceptibility to the pathogen *V.*

anguillarum (33 %), while only a trend was observed for the species *V. alginolyticus* and *V. harveyi*. Glutathione partial depletions also increased oyster susceptibility to cumene and hydrogen peroxides. Studies 2 and 3 suggest that glutathione is not imperative for hemocyte function, however when other components associated to the antioxidant system are affected, or when a second stress challenge is applied, these cells or the whole organism homeostasis is impaired. Overall, these basic studies can make way for many others in the field of aquaculture and ecotoxicology, and contribute to a better understanding of the mechanisms guiding the immune and antioxidant responses of bivalves.

Keywords: bivalve pathogens. *Vibrio*. OsHV-1. hemocytes. glutathione. thiol reductases. immunoparameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de ostras dos gêneros <i>Crassostrea</i> , <i>Ostrea</i> , <i>Saccostrea</i> e <i>Ostreola</i> no mundo.....	23
Figura 2. Anatomia geral de ostras.....	24
Figura 3. Produção mundial de <i>Crassostrea gigas</i> em toneladas.....	26
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	35
Figura 5. Esquema simplificado demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e potenciais danos em biomoléculas durante o processo de fagocitose.....	38
Figura 6. Esquema representando a síntese de glutatona (GSH).....	40
Figura 7. Esquema representando o sistema de detoxificação de hidroperóxidos dependente de glutatona (GSH).	42
Figura 8. Esquema representando o sistema de detoxificação de hidroperóxidos pelas peroxiredoxinas de duas cisteínas (2-cis-Prxs). ..	43
Figura 9. Esquema representando o sistema de detoxificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) pela catalase (Cat).	44
Figura 10. Esquema representando a conjugação de xenobiontes com a glutatona (GSH).	45
Figura 11. Locais de coleta de ostras em Santa Catarina, Brasil.....	50
Figura 12. Amplificação de uma sequência pertencente ao genoma de ostras <i>Crassostrea</i> spp.....	55
Figura 13. Detecção molecular de <i>Vibrio splendidus</i>	56
Figura 14. Detecção molecular do Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). ...	57
Figura 15. Detecção molecular do Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). ...	58
Figura 16. Prevalência dos patógenos <i>Vibrio splendidus</i> e Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) em ostras coletadas em diferentes períodos e locais ao longo do litoral de Santa Catarina.	61
Figura 17. Viabilidade celular de hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostos <i>in vitro</i> a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.	74

Figura 18. Níveis de tióis celulares em hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostos <i>in vitro</i> ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.	75
Figura 19. Atividade de duas tiol redutases de hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostos <i>in vitro</i> a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.	75
Figura 20. Capacidade de adesão e de fagocitose de hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostos <i>in vitro</i> a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.	76
Figura 21. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostos <i>in vitro</i> a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.	77
Figura 22. Figura representativa mostrando o perfil das populações de hemócitos obtido por citometria de fluxo.	85
Figura 23. Níveis de glutatona total (GSH-t) nos tecidos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> tratadas com o agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).	89
Figura 24. Taxa de sobrevivência de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a diferentes concentrações de agentes pró-oxidantes.	91
Figura 25. Taxa de sobrevivência de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a agentes pró-oxidantes após pré-tratamento com o agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).	92
Figura 26. Taxa de sobrevivência de ostras <i>Crassostrea gigas</i> desafiadas com <i>Vibrio</i> spp.	93
Figura 27. Taxa de sobrevivência de ostras <i>Crassostrea gigas</i> desafiadas com víbrios após pré-tratamento com o agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores associados a mortalidades de verão de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	28
Tabela 2. Parâmetros referentes à água do mar.....	50
Tabela 3. Lista dos pares de iniciadores utilizados para a investigação molecular dos diferentes patógenos de interesse.....	53
Tabela 4. Detecção molecular de <i>Vibrio splendidus</i> e Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) em ostras do Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>) e nativas (<i>C. gasar</i>) provenientes de diferentes pontos da costa de Santa Catarina.	60
Tabela 5. Hemograma de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas ao agente depletor de glutathiona butionina sulfoximina (BSO).....	89
Tabela 6. Viabilidade e imunocompetência de hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas ao agente depletor de glutathiona butionina sulfoximina (BSO).	90
Tabela 7. Fagocitose de víbrios inativados marcados com iodeto de propídeo (<i>Vibrio</i> -IP) por hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas ao agente depletor de glutathiona butionina sulfoximina (BSO).	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-cis-Prx	peroxiredoxina contendo uma cisteína
2-cis-Prx	peroxiredoxina contendo duas cisteínas
AMFE	água do mar filtrada estéril
ATP	trifosfato de adenosina
BSO	butionina sulfoximina
Cat	catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHP	hidroperóxido de cumeno
Cis	cisteína
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DHC	contagem diferencial de hemócitos
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
ERO	espécies reativas de oxigênio
FATMA	Fundação do Meio Ambiente do Governo de Santa Catarina
GAPDH	gliceraldéido-3-fosfato desidrogenase
GCL	glutamato-cisteína ligase
GH-t	glutathione total
Gli	glicina
Glu	glutamato
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GS	glutathione sintase
GS [•]	radical tiol de glutathione
GSH	glutathione
GSSG	dissulfeto de glutathione ou glutathione oxidada
GST	glutathione S-transferase
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO [•]	radical hidroxila
IP	iodeto de propídeo
Lam	laminarina
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated</i>

B cells

NMP	número mais provável
$O_2^{\cdot -}$	ânion superóxido
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
pb	pares de base de ácidos nucleicos
PCR	reação em cadeia da polimerase
Prx	peroxiredoxina
PS $^{\cdot}$	radical tiil de proteínas
PSH	tióis proteicos
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
R-OH	álcool
R-OOH	hidroperóxido
SH	tiol
SO ₂ H	ácido sulfínico
SO ₃ H	ácido sulfônico
SOD	superóxido dismutase
SOH	ácido sulfênico
THC	contagem total de hemócitos
T _m	temperatura de fusão
Trx	tioredoxina
TrxR	tioredoxina redutase
<i>Vibrio</i> -IP	víbrios marcados com iodeto de propídeo
VN	vermelho neutro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE	23
1.1 Ostras	23
1.2 Ostricultura.....	25
1.3 Mortalidades massivas de ostras	26
1.3.1 Mortalidades associadas ao OsHV-1	29
1.3.2 Mortalidades associadas a <i>Vibrio</i> spp.....	30
1.3.3 Mortalidades de ostras no Brasil.....	32
1.4 Sistemas de defesa em bivalves	33
1.4.1 Sistema imune	33
1.4.2 Sistema antioxidante	37
1.5 A importância de se estudar os sistemas de defesa de bivalves ..	45
1.6 Objetivo geral do presente trabalho	47
1.7 Objetivos específicos	47
CAPÍTULO 2 - Investigação da presença de potenciais patógenos de ostras em Santa Catarina	49
2.1 Materiais e métodos	49
2.1.1 Coleta dos animais	49
2.1.2 Coleta de tecidos	51
2.1.3 Extração de DNA e condições da PCR.....	51
2.1.4 Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento do DNA e alinhamento.....	53
2.2 Resultados	54
2.2.1 <i>Vibrio</i> spp.	54
2.2.2 OsHV-1	56
2.2.3 Prevalência de <i>V. splendidus</i> e OsHV-1 em Santa Catarina	59
2.3 Discussão	61
CAPÍTULO 3 - Efeitos do composto eletrofílico CDNB sobre a função de hemócitos de ostras do Pacífico.....	69
3.1 Materiais e métodos	69
3.1.1 Animais.....	69
3.1.2 Coleta de hemolinfa	69
3.1.3 Tratamento de hemócitos com CDNB	69
3.1.4 Ensaios de viabilidade celular.....	70
3.1.5 Níveis de glutathiona total e tióis proteicos	71
3.1.6 <i>Atividade de enzimas antioxidantes</i>	71
3.1.7 Adesão celular.....	72
3.1.8 Fagocitose	72
3.1.9 Produção de espécies reativas de oxigênio	73

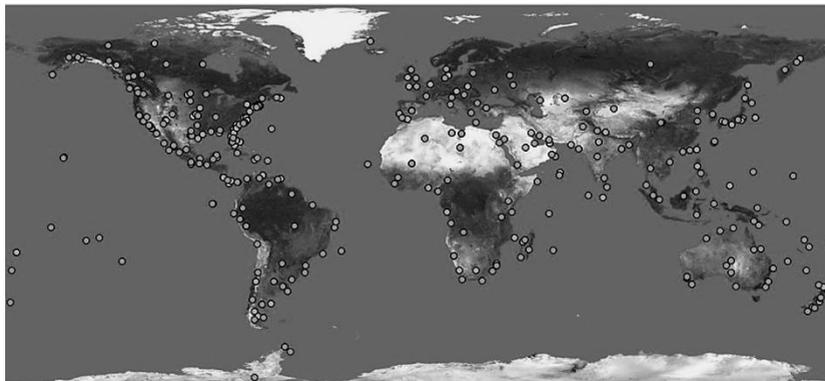
3.1.10 Análise estatística.....	73
3.2 Resultados	73
3.2.1 Viabilidade celular.....	73
3.2.2 Glutaciona total e tióis proteicos.....	74
3.2.3 Atividade de tiol redutases.....	74
3.2.4 Imunocompetência de hemócitos.....	76
3.3 Discussão.....	77
CAPÍTULO 4 – Importância da glutaciona para a função dos hemócitos e para a sobrevivência de ostras do Pacífico mediante DESAFIOS oxidativos ou bacterianos	83
4.1 Materiais e métodos.....	83
4.1.1 Animais e coleta de hemolinfa.....	83
4.1.2 Bactérias.....	83
4.1.3 Tratamentos com BSO.....	84
4.1.4 Análise de GSH-t.....	84
4.1.5 Parâmetros associados aos hemócitos.....	85
4.1.6 Ensaio de sobrevivência.....	86
4.1.6.1 Desafios oxidativos.....	86
4.1.6.2 Desafios bacterianos.....	87
4.1.7 Análises estatísticas.....	87
4.2 Resultados.....	88
4.2.1 Níveis de GSH-t.....	88
4.2.2 Influência da depleção de GSH para a função dos hemócitos.....	88
4.2.3 Importância da GSH para a sobrevivência de ostras desafiadas com peróxidos.....	90
4.2.4 Importância da GSH para a sobrevivência de ostras desafiadas com bacterias do gênero Vibrio.....	91
4.3 Discussão.....	95
CONCLUSÕES	101
PERSPECTIVAS	103
Referências.....	105
ANEXO A.....	121
ANEXO B.....	123
ANEXO C.....	135
ANEXO D.....	137
ANEXO E.....	139

CAPÍTULO 1 –ESTADO DA ARTE

1.1 Ostras

As ostras são moluscos bivalves da família Ostreidae, com uma ampla distribuição mundial, sendo encontradas em todos os continentes (Fig. 1). São bastante apreciadas como alimento, sendo as principais espécies comestíveis pertencentes aos gêneros *Crassostrea*, *Ostrea*, *Saccostrea* e *Ostreola*. No Brasil, são descritas as espécies nativas *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757) e *C. rhizophorae* (GUILDING, 1828). Alguns estudos citam ainda a existência da espécie *C. brasiliana* (Lamarck 1819), contudo estudos moleculares trouxeram fortes evidências de que *C. brasiliana* e *C. gasar* sejam a mesma espécie (DE MELO et al., 2010). Uma vez que o nome *C. gasar* foi descrito anteriormente, este deve ser, portanto, adotado. Atualmente, temos também a presença da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793), também conhecida como ostra japonesa, a qual foi introduzida no Brasil na década de 70 (LITTLEPAGE; POLI, 1999).

Figura 1. Distribuição de ostras dos gêneros *Crassostrea*, *Ostrea*, *Saccostrea* e *Ostreola* no mundo.

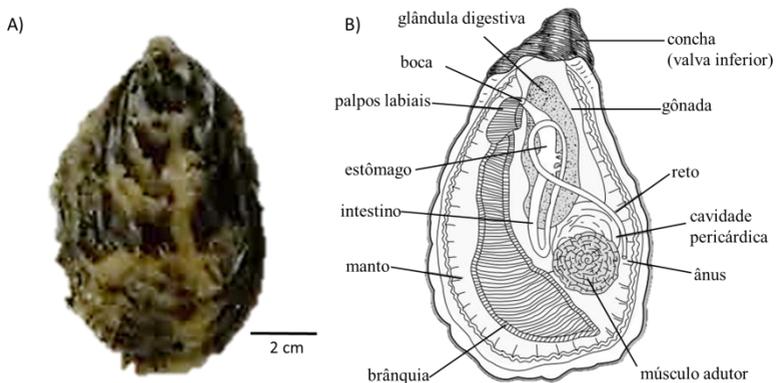


Fonte: Discover Life(2016).

As ostras (Fig. 2) são organismos sésseis que se alimentam através de partículas em suspensão na coluna d'água. São caracterizadas por terem um corpo mole envolto em uma concha composta por calcário, a qual consiste de duas valvas que contam com o suporte de um único, porém robusto, músculo adutor. As conchas são produzidas pelo manto, tecido que recobre todo o corpo mole da ostra, exceto na

região do músculo adutor. Possui dois pares de brânquias, responsáveis pela respiração e filtração do alimento, os quais são então levados até os palpos labiais, onde é feita uma seleção deste alimento, para posteriormente serem levadas à boca. Em seguida o alimento é digerido no estômago, o qual está envolto numa glândula digestiva, e é então absorvido pelo intestino. O alimento não aproveitado (fezes) é eliminado através do ânus, normalmente localizado na cavidade do manto próximo à região onde o fluxo de água se direciona para fora do animal (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

Figura 2. Anatomia geral de ostras.



(A) Exemplo de ostra *Crassostrea gigas* adulta mostrando a valva superior; (B) esquema representando as estruturas de uma ostra com a valva e manto superiores removidos. Adaptado de: FAO (2001).

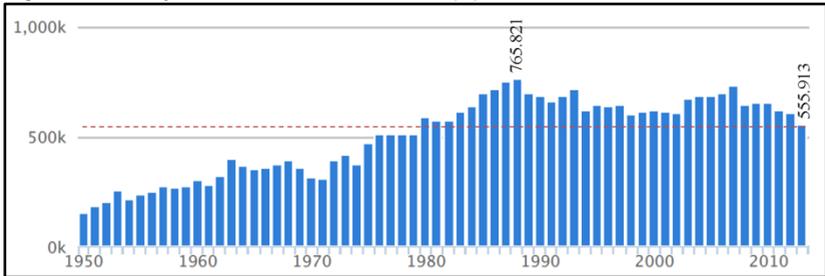
Assim como muitas outras espécies de moluscos, as ostras são capazes de modificar significativamente o seu habitat, contribuindo com a biodiversidade e ajudando a manter a qualidade da água e a ciclagem de nutrientes. Sendo assim, fatores que possam prejudicar a sobrevivência de bivalves no ambiente, como patógenos ou contaminantes químicos, podem trazer grandes prejuízos aos ecossistemas habitados por estes seres vivos (COEN; BISHOP, 2015). É interessante ressaltar que cultivos de bivalves, em alguns casos, fornecem as mesmas vantagens ao ecossistema que os ambientes selvagens dominados por estes organismos (COEN; BISHOP, 2015).

1.2 *Ostreicultura*

A maricultura, uma das maiores atividades de aquicultura em todo o mundo, está aumentando continuamente e apresenta-se como uma importante ferramenta para substituir a pesca predatória (FAO, 2014). O cultivo de bivalves já equivale a cerca de 36 % de toda a produção mundial de produtos aquícolas, enquanto que a produção de peixes ósseos, por exemplo, contribui com apenas 10 %, em termos de toneladas (COEN; BISHOP, 2015). O Brasil, apesar de possuir uma produção ainda limitada, quando comparada com outros países, é um dos maiores produtores de moluscos da América do Sul (FAO, 2014). Em 2013 o cultivo de ostras, vieiras e mexilhões foi de 19.359 toneladas representando um valor de 58 milhões de reais (IBGE, 2013). A maricultura é especialmente importante para o estado de Santa Catarina, uma vez que, neste mesmo ano, o estado produziu 19.082 toneladas (EPAGRI, 2015), colocando-o assim como responsável por mais de 98% da produção nacional de moluscos. Já em 2014 a safra de mexilhões, ostras e vieiras de Santa Catarina subiu para 21.553 toneladas, produção esta que envolveu 610 maricultores (EPAGRI, 2015), constituindo, portanto, uma importante fonte de renda para diversas famílias de pescadores artesanais do estado.

Dentre os moluscos cultiváveis podem ser destacadas as ostras da espécie *C. gigas*. A produção desta espécie de ostras é disseminada no mundo todo, ocorrendo na Europa (França, Espanha, Reino Unido, Irlanda e Noruega), nas Américas (Brasil, Estados Unidos, Canadá, México, Argentina, Chile, Equador, Peru e Ilhas Malvinas), na África (Marrocos, Tunísia, África do Sul, Namíbia e Senegal) e na Oceania (Austrália, Nova Zelândia e Nova Caledônia) (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Essa ampla disseminação ocorreu, principalmente, devido ao seu elevado potencial de cultivo, tendo hoje uma alta representatividade socioeconômica em muitos países. Atualmente enquadra-se como o décimo oitavo produto aquícola mais cultivado do mundo, levando em consideração todos os grupos animais e, apesar de ter ocupado o primeiro lugar entre os moluscos por muitos anos, hoje ocupa a terceira posição, estando atrás apenas da amêijoia japonesa *Ruditapes philippinarum* (ADAMS; REEVE, 1850) e da amêijoia chinesa *Sinonovacula constricta* (LAMARCK, 1818) (FAO, 2012). Em 2013 a produção de *C. gigas* correspondeu a mais de 555 mil toneladas, mas já foi bem mais expressiva em anos anteriores, chegando a 765 mil em 1988 (Fig. 3).

Figura 3. Produção mundial de *Crassostrea gigas* em toneladas.



Adaptado de: FAO (2016).

Em 2014, o cultivo de ostras rendeu para o estado de Santa Catarina quase 18 milhões de reais, gerando renda para 117 famílias de produtores (EPAGRI, 2015). Atualmente, o município de Florianópolis é o maior produtor de *C. gigas* (2.707 toneladas), seguido pelos municípios de Palhoça (576 toneladas) e São José (181 toneladas), todos pertencentes à chamada Grande Florianópolis, o que evidencia a importância desta região para o estado. Entre outros municípios produtores de ostras podem ser citados Biguaçu e Balneário Barra do Sul, os quais ocupam o sexto e sétimo lugar entre os maiores produtores do estado, produzindo 40 e 20 toneladas, respectivamente (EPAGRI, 2015). Desta forma, o cultivo de ostras, assim como de outros bivalves, compreende uma importante atividade econômica e social, servindo de alimento, empregando diversas famílias de pescadores artesanais e contribuindo com a economia da região.

Como mencionado anteriormente, no Brasil, além da espécie introduzida *C. gigas*, são encontradas duas outras espécies de ostras nativas: *C. gasar* e *C. rhizophorae*. Cerca de 10 % do cultivo nacional depende destas duas espécies de ostras nativas (RAMOS, 2011). Em Santa Catarina, alguns poucos cultivos também vêm utilizando *C. gasar*, contudo esta espécie é mais cultivada em regiões mais quentes do país (POLI, 2004).

1.3 Mortalidades massivas de ostras

A microbiota de ambientes marinhos é extremamente abundante e diversa. Um litro de água do mar de ambientes costeiros contém tipicamente milhões de microalgas, bilhões de bactérias e outros microrganismos eucariotos, e até 100 bilhões de partículas virais (BEN-HORIN et al., 2015). Vários grupos de animais se adaptaram de modo a

aproveitar este nicho para sua dieta, entre eles os bivalves. Animais filtradores possuem diversos mecanismos capazes de selecionar e capturar as partículas em suspensão, as quais estão normalmente associadas a grãos minerais, detritos, e várias outras partículas que acabam por ingerir acidentalmente, incluindo microrganismos patogênicos (BEN-HORIN et al., 2015). Sob condições de equilíbrio, muitos destes patógenos não conseguem proliferar na mesma velocidade em que são eliminados pelos sistemas de seus hospedeiros, permitindo assim a sobrevivência dos bivalves. Contudo, quando o sistema imune é afetado por fatores intrínsecos ou extrínsecos, uma das consequências possíveis é a proliferação destes patógenos oportunistas, os quais podem causar mortalidades resultantes de infecções (SCHMITT et al., 2011).

Recorrentes episódios de mortalidade de bivalves associados a patógenos constitui um dos principais impedimentos para o desenvolvimento da maricultura, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas em diversos países ao redor do mundo. Uma ampla variedade de organismos pode causar doenças em bivalves, entre eles vírus, bactérias, protozoários e até metazoários, podendo levar a mortalidades (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994; DA SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2011; ELSTON, 1997; LANE; BIRKBECK, 2000; LAUCKNER, 1983; PAILLARD; ROUX; BORREGO, 2004; RENAULT; NOVOA, 2004; SINDERMANN, 1990).

Entre os episódios de mortalidade de bivalves mais bem relatados e investigados estão os relativos à espécie *C. gigas*, o que não surpreende, já que é uma das espécies mais cultivadas no mundo (FAO, 2012). Os episódios de mortalidades de ostras do Pacífico que vêm ocorrendo nas últimas décadas podem ser diferenciados em “mortalidades de verão”, as quais afetam principalmente ostras adultas, e “mortalidades de sementes e juvenis”, sendo estas últimas referidas a episódios mais recentes, normalmente associadas a patógenos específicos (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; EFSA, 2010).

As mortalidades de verão foram assim designadas pois afetam tipicamente estes animais nos meses mais quentes do ano, quando suas gônadas estão mais maduras. De fato, um fator em comum à grande maioria destes eventos de mortalidade em diferentes países é o distúrbio metabólico/fisiológico causado pelo crescimento e maturação das gônadas, acompanhado de um aumento no consumo de glicogênio e lipídios como fontes de energia (EFSA, 2010). Mortalidades desse tipo

já foram registradas em diversos países como Japão, Estados Unidos, Espanha, Irlanda e França, sendo observadas taxas de mortalidades de 20 até 95 % (EFSA, 2010). As mortalidades de sementes e juvenis, por sua vez, também são correlacionadas com o aumento da temperatura da água. Contudo, essa relação aparenta estar ligada, principalmente, à ativação e maior proliferação de alguns patógenos específicos (EFSA, 2010). De fato, o estresse fisiológico associado à maturação das gônadas não aparenta ser o único agente causador das mortalidades de verão. As possíveis causas destas mortalidades em ostras do Pacífico ainda não estão completamente elucidadas, no entanto, vários estudos têm sugerido uma interação complexa de diferentes fatores (Tabela 1).

Trabalhos recentes apontam o vírus do herpes que infecta ostras ou Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) e duas espécies de vibrios, *Vibrio splendidus* e *V. aestuarianus*, como os principais patógenos responsáveis pelos grandes surtos de mortalidade ocorridos nas últimas décadas (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; EFSA AHAW PANEL, 2015; EFSA, 2010).

Tabela 1. Fatores associados a mortalidades de verão de ostras *Crassostrea gigas*.

Fatores de Risco	
Ambientais	Altas temperaturas da água Baixos níveis de oxigênio dissolvido Eutrofização Redução da salinidade Presença de contaminantes químicos Floração de algas nocivas Manejo dos sistemas de produção
Hospedeiro	Riscos associados à reprodução (maturação das gônadas) Fatores genéticos
Microrganismos	<i>Vibrio splendidus</i> <i>Vibrio aestuarianus</i> OsHV-1

Adaptado de: EFSA (2010).

1.3.1 Mortalidades associadas ao OsHV-1

Mortalidades massivas de ostras *C. gigas* associadas a um vírus da família Herpesviridae foram registradas pela primeira vez na França durante o verão de 1991. Estes afetaram ostras em estágio larval desenvolvidas em criadouros (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Neste mesmo ano, evento semelhante ocorreu com larvas de ostras na Nova Zelândia. Em ambos os casos foram registradas mortalidades de até 100 %. As larvas foram então examinadas por microscopia eletrônica de transmissão, sendo constatada a presença de capsídeos de vírus característicos da família Herpesviridae (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Mortalidades de ostras mais desenvolvidas (3 a 7 meses de idade) foram observadas no verão de 1993, novamente na França, chegando a 90 %. Novamente, vírus característicos da família Herpesviridae foram observados e, juntamente com análises moleculares, uma nova espécie de vírus foi descrita, sendo chamada de Ostreid herpesvirus 1 ou OsHV-1 (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Esta espécie foi classificada como pertencente ao gênero Ostreavirus da família Malacoherpesviridae. Desde então, este vírus tem sido detectado molecularmente durante episódios de mortalidades massivas de ostras em vários outros países: França, Irlanda, Inglaterra, Espanha, Itália, Holanda, Portugal, Noruega, Nova Zelândia, Coreia do Sul, Japão, China, México, e Estados Unidos (EFSA AHAW PANEL, 2015).

De modo geral, infecções causadas pelo OsHV-1 têm sido principalmente associadas a grandes taxas de mortalidades em sementes e juvenis de ostras, contudo, apresentando taxas menores de mortalidade em ostras adultas (EFSA AHAW PANEL, 2015). Este vírus também é capaz de infectar e causar mortalidades (embora menos intensas) em outros bivalves, como vieiras, mexilhões e berbigões (EFSA AHAW PANEL, 2015; MARTENOT et al., 2015). Muitos estudos laboratoriais e em campo têm demonstrado que um dos fatores com maior correlação com os episódios de mortalidades causados pelo OsHV-1 é o aumento brusco da temperatura da água do mar. Um limiar preciso de temperatura para o desenvolvimento da infecção ainda não foi estabelecido, uma vez que este é variável, dependendo da região. Por exemplo, em algumas partes da França o vírus começa a ser detectado em ostras quando a água atinge 16 °C, enquanto que nos Estados Unidos apenas quando a temperatura atinge 22 °C (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Este vírus, assim como outros da

família Herpesviridae, possuem a capacidade de persistir por longos períodos em seu hospedeiro (EFSA AHAW PANEL, 2015).

Desde o sequenciamento do genoma do OsHV-1 e, posteriormente, a realização de estudos de polimorfismo genético, diversas variantes deste vírus já foram descritas. Dentre estas, a variante que aparenta estar associada aos eventos de mortalidades mais severos é a OsHV-1 μ Var, detectada pela primeira vez em amostras de ostras obtidas durante o verão de 2008 na França (MARTENOT et al., 2015). Desde então, episódios de mortalidades envolvendo a ostra *C. gigas* tem aumentado em termos de intensidade e distribuição geográfica (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015).

1.3.2 Mortalidades associadas a *Vibrio* spp.

O gênero *Vibrio* inclui atualmente 142 espécies de bactérias (SAWABE et al., 2013), tem distribuição mundial, e é amplamente difundido no ambiente aquático, com preferência por águas salinas e com temperaturas acima de 15 °C (ROUX et al., 2015). Os vibrios são bactérias Gram-negativas, têm forma de bastonete curvo, e se movimentam a partir de um único flagelo polar (SAWABE et al., 2013). Este gênero compreende muitas espécies patogênicas para humanos e para organismos aquáticos, incluindo peixes, corais e bivalves (ROUX et al., 2015). A espécie *V. cholerae*, patogênica para humanos, é de longe a mais temida e bem estudada do grupo. Contudo, outras espécies têm recebido atenção na última década. Entre as espécies classicamente patogênicas para humanos podem ser citadas: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus*, as quais infectam os seres humanos normalmente através de alimentos contaminados (PRUZZO; GALLO; CANESI, 2005). De fato, muitos bivalves, devido ao seu hábito filtrador, bioacumulam estas bactérias apresentando concentrações até 100 vezes maiores em seus tecidos, em comparação à coluna d'água (PRUZZO; GALLO; CANESI, 2005). Portanto, os bivalves são uma importante fonte de transmissão destes patógenos aos seres humanos. Ademais, estudos como estes demonstram que os vibrios são componentes regulares da microflora de bivalves, representando um importante nicho ecológico para essas bactérias (PRUZZO; GALLO; CANESI, 2005).

Muitos vibrios causam doenças em bivalves, assim como em outros organismos aquáticos, incluindo algumas espécies que, classicamente, são descritas como patogênicas para humanos. A espécie

V. vulnificus, por exemplo, foi associada a doenças em peixes e crustáceos (ROUX et al., 2015), enquanto que *V. alginolyticus* já foi isolado de ostras *Saccostrea glomerata* (GREEN; BARNES, 2009) e amêijoas *Venerupis decussatus* (TRAVERS et al., 2015) doentes. No entanto, muitas outras espécies de víbrios estão principalmente associadas a doenças em organismos aquáticos, e não em seres humanos. Entre as espécies com maior associação a mortalidades de bivalves, estão: *V. aestuarianus* (TRAVERS et al., 2015), espécies pertencentes ao clado *Harveyi* (e.g. *V. harveyi*), e ao clado *Splendidus* (e.g. *V. splendidus* e *V. tasmaniensis*) (TRAVERS et al., 2015), assim como a espécie *V. anguillarum* (BRAMBLE; ANDERSON, 1997; WU et al., 2013).

Os mecanismos de virulência (capacidade de infecção) e de patogenicidade (capacidade de causar doenças mediante infecção) da maioria destas espécies de víbrios ainda não estão bem estabelecidos para bivalves (TRAVERS et al., 2015). No entanto, sabe-se que algumas destas espécies são oportunistas e causam doenças quando o hospedeiro se encontra lesionado ou com seu sistema imune comprometido (WU et al., 2013). Ainda, a virulência e a patogenicidade de algumas destas espécies se dá, muitas vezes, através de interações entre diferentes cepas (GAY et al., 2004) ou entre diferentes espécies (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015).

Nos eventos de mortalidade mais severos que ocorreram com a ostra do Pacífico a partir de 2008, cepas designadas como *V. splendidus* foram quase sempre detectadas juntamente com o OsHV-1 μ Var (PERNET et al., 2012). No entanto, existe uma diversidade muito grande de espécies que são bem semelhantes à cepa referência *V. splendidus* LMG 4042 (NASFI et al., 2015), as quais são normalmente designadas de *V. splendidus-related* ou pertencentes ao clado *Splendidus* (TRAVERS et al., 2015). Por exemplo, a cepa *V. splendidus* LGP32, isolada de ostras do Pacífico durante um episódio de mortalidade de verão (LE et al., 2002) foi, a partir de análises filogenéticas, posteriormente renomeada para *V. tasmaniensis* LGP32 (SAWABE et al., 2013). Mesmo em meio a esse desafio quanto à classificação deste grupo, vários estudos indicam que bactérias pertencentes ao clado *Splendidus* estão envolvidas em episódios de mortalidades de ostras, destacando-se as espécies *V. splendidus* e *V. tasmaniensis* (TRAVERS et al., 2015).

A segunda espécie de víbrio mais frequentemente associada a eventos de mortalidade de ostras é *V. aestuarianus*, a qual foi isolada da hemolinfa de ostras do Pacífico durante um episódio de mortalidade

(EFSA, 2010). Experimentos desafiando ostras com esta espécie confirmaram a sua capacidade de causar mortalidades, no entanto, algumas cepas foram mais virulentas do que outras, ou até mesmo avirulentas (TRAVERS et al., 2015). Esta espécie é capaz de infectar as ostras em todas as fases de vida, mas parece ter mais preferência por juvenis e adultas (TRAVERS et al., 2015).

Bactérias pertencentes a outros gêneros também têm sido associadas a doenças severas em ostras e outros bivalves, como por exemplo: *Nocardia crassostreae* e *Roseovarius crassostreae*, responsáveis pela nocardiose e pela “*juvenile oyster disease*”, respectivamente, as quais afetam principalmente ostras. Organismos assemelhados a *Rickettsia*, os quais já foram detectados em várias espécies de bivalves, também podem causar grandes mortalidades (TRAVERS et al., 2015). A intensificação das mortalidades de bivalves e os frequentes relatos de ocorrência destes e de outros patógenos, apenas reforçam a necessidade de estudos globais, que visem aprofundar o conhecimento na área de patologia de bivalves.

1.3.3 Mortalidades de ostras no Brasil

No Brasil, até a presente data, não foram encontrados registros da presença do OsHV-1, *V. aestuarianus* e espécies pertencentes ao clado *Splendidus*, organismos estes comumente associados às mortalidades massivas que vêm ocorrendo nas últimas décadas em muitos outros países (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). No entanto, acredita-se que esta falta de registro é devido à ausência de investigações referentes à presença destes microrganismos. De fato, estudos investigando patógenos e doenças de bivalves são bastante escassos no Brasil, em comparação a outros países (BOEHS et al., 2010), fortemente indicando a necessidade de tais estudos.

Mortalidades massivas de verão já foram reportadas no Brasil afetando tanto ostras nativas (NASCIMENTO et al., 1986; SABRY; MAGALHÃES, 2005), quanto ostras do Pacífico (SABRY; MAGALHÃES, 2005; SILVEIRA, 1997). Em Santa Catarina, no verão da década de 90, a mortalidade em cultivos de ostras do Pacífico chegou a 89 % em algumas fazendas marinhas (SILVEIRA, 1997). Em 2003 foram observadas mortalidades de ostras do Pacífico (48 %) e de ostras nativas *C. rhizophorae* (70 %) em um cultivo localizado no município de Florianópolis (SABRY; MAGALHÃES, 2005). Neste estudo, foram realizadas análises macroscópicas e histológicas, sendo detectados

alguns parasitas e protozoários, no entanto nenhum destes foi associado às mortalidades (SABRY; MAGALHÃES, 2005). Uma vez que na literatura não se tem muitos registros de mortalidades massivas de ostras no Brasil, acredita-se que estas sejam isoladas e bastante raras. Normalmente, as taxas de mortalidade são estimadas em aproximadamente 20 % ao longo do ano, segundo um levantamento realizado em alguns cultivos de Florianópolis (PONTINHA, 2009). Porém, quando estas mortalidades ocorrem, há indícios de que um dos fatores de risco seja o período de reprodução (maturação das gônadas) (MAGALHAES; FERREIRA, 2006), de forma semelhante ao relatado em outros países (EFSA, 2010), como discutido anteriormente. Em um estudo mais recente, realizado entre dezembro de 2010 e agosto de 2011, ostras do Pacífico transferidas de um criadouro para um cultivo no início do verão (dezembro) apresentaram uma mortalidade acumulada de 89 %, enquanto que ostras transferidas após o fim do verão (março), apresentaram apenas 23 % (MEDEIROS, 2012). Os agentes causadores da elevada mortalidade obtida com as ostras transferidas no início do verão não foram definidos, porém, está claro que fatores associados à sazonalidade, como por exemplo, maturação da gônada, temperatura da água, presença de contaminantes e proliferação de microrganismos, influenciam de maneira significativa a taxa de sobrevivência de ostras cultivadas.

Estudos básicos que visam compreender melhor a fisiologia do hospedeiro, em especial suas respostas de defesa contra agentes infecciosos, são fundamentais em abordagens que visam melhorar a resistência de ostras contra doenças e diferentes fatores de estresse. A quantidade de informação disponível abrangendo os sistemas de defesa de bivalves e os mecanismos moleculares envolvidos vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, no entanto, ainda é bastante restrito em comparação ao sistema imune de mamíferos (SONG et al., 2010).

1.4 Sistemas de defesa em bivalves

1.4.1 Sistema imune

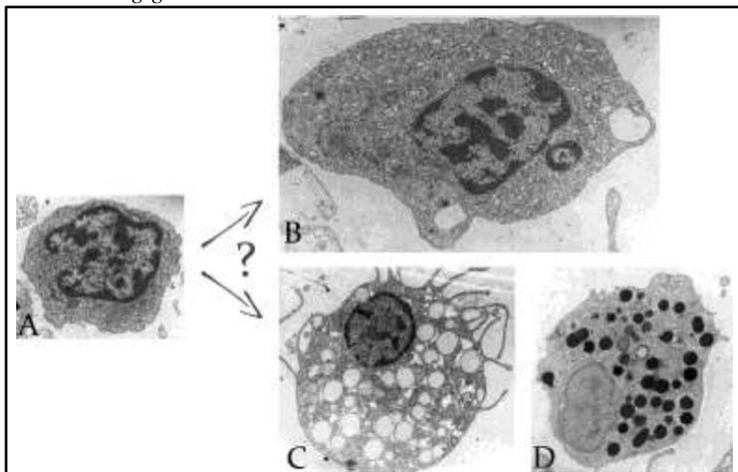
Durante muitos anos, o sistema imune dos invertebrados foi reconhecido por se basear apenas em mecanismos inatos. Acreditava-se que a especificidade contra antígenos, a expansão clonal, a produção de células de memória e a capacidade de produzir respostas diferenciadas

mediante um segundo encontro com o antígeno eram todas respostas exclusivas do sistema imune adaptativo dos vertebrados. Contudo, várias evidências têm surgido apontando para a existência de fenômenos ligados à memória, assim como mecanismos geradores de uma maior diversidade e especificidade na resposta imune de invertebrados (ARMITAGE; PEUSS; KURTZ, 2015; SUN; UGOLINI; VIVIER, 2014). Estes mecanismos já foram demonstrados, inclusive, em uma espécie de molusco: o caramujo *Biomphalaria glabrata* (ZHANG et al., 2004). Estes achados recentes, apenas evidenciam o pouco conhecimento que se tem a respeito do sistema imune dos invertebrados, incluindo os bivalves, em comparação ao dos vertebrados. Apesar disso, o interesse em compreender os mecanismos básicos que permeiam a capacidade de defesa dos bivalves contra patógenos vem crescendo consideravelmente. Possivelmente, isto se deve ao aumento da frequência e distribuição geográfica das mortalidades massivas que vêm atingindo este grupo.

Quando microrganismos patogênicos conseguem ultrapassar a concha e tecidos epiteliais como manto e brânquias, consideradas como as primeiras linhas de defesa de bivalves, enfrentam defesas celulares e humorais do hospedeiro, as quais atuam no reconhecimento e eliminação destes microrganismos (SCHMITT et al., 2011). Os hemócitos são os principais protagonistas das reações celulares do sistema imune de bivalves. No entanto, estas células participam também de outros processos vitais para o organismo, como o reparo de ferimentos, recalcificação da concha, transporte de nutrientes, assim como processos de digestão e excreção (SCHMITT et al., 2011). A classificação dos diferentes tipos de hemócitos de bivalves é bastante controversa, uma vez que não há um consenso entre a origem, maturação, meia-vida e função das possíveis linhagens celulares (SCHMITT et al., 2011). Contudo, de modo geral existem duas principais populações: os hemócitos granulares e os hialinos (Fig. 4) (KWON et al., 2006; SONG et al., 2010). Os hemócitos granulares são normalmente ricos em grânulos contendo enzimas hidrolíticas, sendo considerados como os mais ativos no processo de fagocitose (SONG et al., 2010). Os hemócitos hialinos constituem um grupo bastante heterogêneo morfológicamente. Os hemócitos hialinos pequenos normalmente apresentam uma relação núcleo:citoplasma bastante elevada, e contém praticamente nenhum grânulo ou vesícula. Estes são também conhecidos como células semelhantes a precursoras (ou *blast-like cells*), e especula-se dar origem aos outros tipos celulares (SCHMITT et al., 2011). Já os hemócitos hialinos grandes, apesar de também não apresentarem muitos

grânulos, podem conter muitas vesículas e ter uma proporção núcleo:citoplasma menor. Alguns estudos, sugerem que os hemócitos hialinos grandes também são capazes de realizar fagocitose, incluindo algumas partículas diferentes das normalmente fagocitadas pelos hemócitos granulares (SCHMITT et al., 2011). Bivalves infectados com microrganismos patogênicos apresentam frequentemente alterações na concentração e proporção de hemócitos em seu sistema circulatório (hemolinfa). Desta forma, o hemograma de bivalves, representado pela contagem total (THC) e diferencial (DHC) de hemócitos, funciona como um dos imunoparâmetros mais amplamente utilizados para avaliar as condições de saúde destes moluscos (COMESAÑA et al., 2012; PARISI et al., 2008; ZHANG et al., 2014).

Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de ostras *Crassostrea gigas*.



(A) Hemócito hialino pequeno (também conhecido como célula precursora); (B) hemócito hialino grande; (C e D) hemócitos granulares. O ponto de interrogação indica que não se sabe se os hemócitos granulares ou hialinos grandes derivam das células precursoras. Micrografias apresentadas com magnificação de 15.000 \times . Fonte: Schmitt et al. (2011)

Mediante infecções, os hemócitos reconhecem padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*) através de seus receptores de padrões “não-próprios”. Entre os PAMPs mais estudados, e que são reconhecidos pelos hemócitos, estão: os lipopolissacarídeos de bactérias

Gram-negativas; o ácido lipoteicóico, presente na parede de bactérias Gram-positivas; β -1,3-glicanas, componentes da parede de fungos; ácido ribonucleico de dupla fita devírus; entre outros(SCHMITT et al., 2011). O reconhecimento de PAMPs desencadeia uma série de respostas celulares e humorais que atuam na eliminação dasinfecções (SCHMITT et al., 2011).

A capacidade de adesão celular, mediada por receptores como a integrina, por exemplo, é de fundamental importância para as respostas de hemócitos, uma vez que está envolvida em eventos de espriamento celular, degranulação, encapsulação e fagocitose (SCHMITT et al., 2011). A fagocitose, por sua vez, é uma das primeiras respostas imunes que atuam na eliminação de microrganismos invasores, desempenhando, portanto, um papel essencial para a sobrevivência dos bivalves (ZHANG et al., 2014). Diferentes tipos de células e partículas podem ser fagocitadas pelos hemócitos de bivalves, incluindo bactérias, algas, leveduras, células sanguíneas não-próprias e esferas de látex (SONG et al., 2010). A fagocitose envolve uma série de processos, os quais devem ser precisamente regulados, que correspondem à adesão, formação de pseudópodes, internalização via fagossomo e maturação do fagossomo (SCHMITT et al., 2011). Dentro de um fagolisossomo maduro, lipases, proteases, lisozima e péptidos antimicrobianos atuam de forma conjunta na inativação de partículas não-próprias fagocitadas (SCHMITT et al., 2011). Além destas, outras reações microbicidas também ocorrem, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)(SCHMITT et al., 2011).

A produção de ERO associada a mecanismo de defesa microbicida inicia-se com a ativação de um complexo enzimático denominado fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidase. Este complexo encontra-se associado, principalmente, mas não exclusivamente, às membranas plasmática e lisossomal gerando ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e/ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2)(BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007). Hemócitos de muitas espécies de bivalves são capazes de produzir ERO (vide revisões de DONAGHY et al., 2009, 2014; SCHMITT et al., 2011; SONG et al., 2010). No entanto, este processo parece ocorrer de forma distintaem hemócitos de bivalves em comparação às células imunes de vertebrados. Estas apresentam uma resposta rápida e com intenso consumo de O_2 e produção de ERO, fenômeno conhecido como “burst” respiratório (BROWN; GRIENGLING, 2009). Em hemócitos de *C. gigas*, alguns estudos demonstram que a geração de ERO aumenta apenas cerca de 2-10 vezes, e o pico ocorre entre 15 e 40 min após a estimulação, ao passo

que em fagócitos de vertebrados o "*burst*" ocorre dentro de poucos minutos, podendo ser até 1500 vezes maior que a atividade basal (DONAGHY et al., 2014). Sendo assim, ainda não existe um consenso se a produção de ERO por hemócitos de bivalves está diretamente envolvida em mecanismos microbicidas, contudo não se descarta a possibilidade de que participem de funções fisiológicas dos hemócitos (DONAGHY et al., 2009; DONAGHY et al., 2014). Por exemplo, a produção de ERO pelos hemócitos está envolvida em mecanismos de morte celular programada, como a apoptose (TERAHARA; TAKAHASHI, 2008). Ademais, já foi demonstrado que a produção de ERO em hemócitos de *C. gigas* é indispensável para a liberação de DNA para o meio extracelular, formando armadilhas responsáveis pelo enredamento e captura de bactérias (POIRIER et al., 2014).

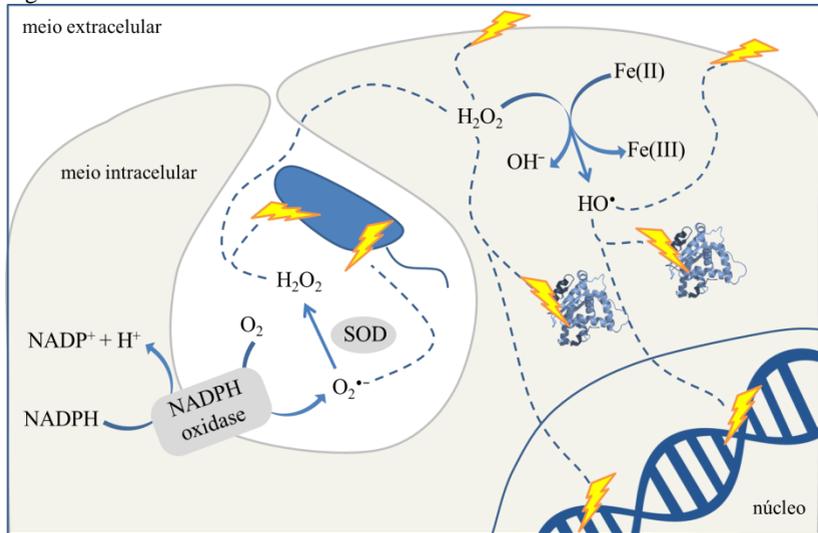
1.4.2 Sistema antioxidante

Todas as células que realizam respiração e fotossíntese produzem níveis basais de ERO (LESSER, 2006). As ERO são moléculas muito instáveis que normalmente contêm um ou mais elétrons desemparelhados (à exceção do H_2O_2 , por exemplo), reagindo rapidamente com moléculas e estruturas celulares próximas, tais como membranas, DNA e proteínas, proporcionando um grande potencial deletério para as funções celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, estas moléculas também podem participar de vias fisiológicas de sinalização celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), atuando em processos de ativação, crescimento, proliferação e morte celular (TRACHOOTHAM et al., 2008). Sendo assim, é de fundamental importância que os mecanismos de regulação dos níveis de ERO intracelulares sejam rigorosamente regulados.

Como mencionado acima, durante a ativação de fagócitos "profissionais", elevadas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são produzidas via NADPH oxidase (CROSS; SEGAL, 2004). O H_2O_2 , além ser formado por um grupo específico de NADPH oxidases (dual oxidases ou DUOX), também é formado pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, a qual pode ocorrer de forma espontânea ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) (LESSER, 2006). Por ser mais estável e não conter carga, o H_2O_2 é permeável às membranas biológicas, tendo o potencial de danificar biomoléculas presentes nos próprios fagócitos, assim como em células vizinhas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SEGAL, 2008). O H_2O_2 pode ser posteriormente reduzido por metais de transição (reação

de Fenton), formando o radical hidroxila (HO^\bullet), uma das ERO mais reativas, atacando as primeiras moléculas biológicas que encontram. O HO^\bullet tem o potencial de iniciar reações de geração de radicais livres em cadeia, oxidar lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Fig. 5) (LESSER, 2006). Sendo assim, moléculas e sistemas capazes de controlar os níveis de peróxidos são cruciais para proteger as células contra concentrações nocivas de ERO como, por exemplo, as que ocorrem durante infecções causadas por microrganismos patogênicos (FORMAN; TORRES, 2002).

Figura 5. Esquema simplificado demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e potenciais danos em biomoléculas durante o processo de fagocitose.



Após ativação da NADPH oxidase, são produzidas ERO como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^\bullet) em presença de metais de transição reduzidos como o Fe(II) . Estas ERO têm a capacidade de oxidar biomoléculas como lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos (⚡). Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A fim de regular os níveis de ERO intra e extracelulares, os organismos vivos, incluindo desde bactérias, até animais vertebrados e invertebrados, contam com um complexo sistema de defesas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estas defesas são de natureza, tanto enzimática, como não-enzimática. Dentre os antioxidantes não-enzimáticos de maior importância para as células de

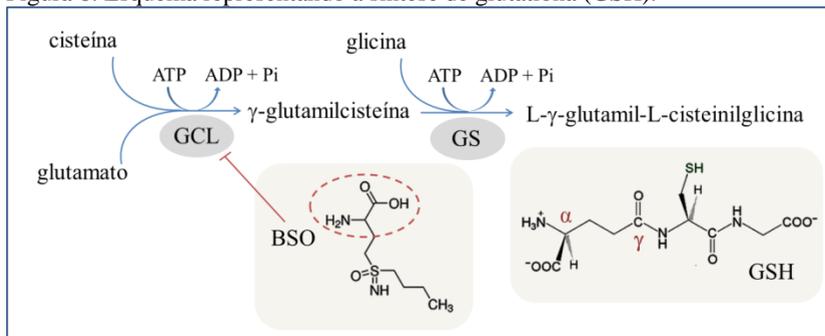
organismos aeróbios, encontram-se o ácido ascórbico, os tocoferóis, os carotenos, os flavonóides, o ácido úrico, a glutationa (GSH) e a tioredoxina (Trx).

A GSH é um tripeptídeo composto de L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina, encontrado em altas concentrações no interior da célula (1–10 mM) (TIPPLE; ROGERS, 2012). A síntese de GSH ocorre via duas reações de síntese dependentes de ATP (Fig. 5). Primeiramente, os aminoácidos cisteína e glutamato são unidos através do carbono gama do glutamato para a formação de uma ligação peptídica incomum, gerando o produto γ -glutamilcisteína. Este primeiro e limitante passo na síntese de GSH é catalisado pela enzima glutamato-cisteína ligase (GCL). Posteriormente, a glicina é então adicionada à γ -glutamilcisteína pela glutationa sintase (GS) através de uma ligação peptídica clássica, formando então a GSH (Fig. 6) (LU, 2013). Acredita-se que esta ligação gama confere proteção à GSH contra a degradação por aminopeptidases (SIES, 1999). A existência de um inibidor específico para GCL, a butionina sulfoximina (BSO) (Fig. 6), permitiu inúmeros estudos sobre a importância da GSH em diversos cenários e sistemas (MEISTER; ANDERSON, 1983). O BSO liga-se à GCL, especificamente e irreversivelmente ao sítio de ligação da cisteína, onde é fosforilado, impedindo assim sua liberação e promovendo a inativação desta enzima (MEISTER; ANDERSON, 1983). Por ser altamente específico, não apresenta toxicidade celular (MEISTER; ANDERSON, 1983). Inúmeros estudos, principalmente em mamíferos, puderam demonstrar que o BSO pode ser aplicado com sucesso na depleção dos níveis de GSH, sendo demonstrado em diversos modelos animais e tipos celulares, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (MEISTER; ANDERSON, 1983), inclusive em bivalves (CANESI et al., 2000; CONNERS; RINGWOOD, 2000; RINGWOOD; CONNERS, 2000).

A GSH está localizada em diferentes compartimentos intracelulares, participando de diversos processos biológicos. Dentre as funções mais conhecidas e estudadas estão: a manutenção do estado redox celular, a redução de hidropéroxidos, a conjugação com compostos eletrofílicos e a proteção de tióis proteicos contra oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além destes, a GSH também participa de outros processos de grande importância para os sistemas biológicos como: a síntese de DNA, o metabolismo do ascorbato, a comunicação celular através de junções comunicantes, a detoxificação de metilglioxal e aldeídos, a síntese de leucotrienos, o enovelamento correto de proteínas e a degradação de proteínas contendo pontes

dissulfeto (DEPONTE, 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KEHRER; LUND, 1994; MEISTER; ANDERSON, 1983).

Figura 6. Esquema representando a síntese de glutathiona (GSH).



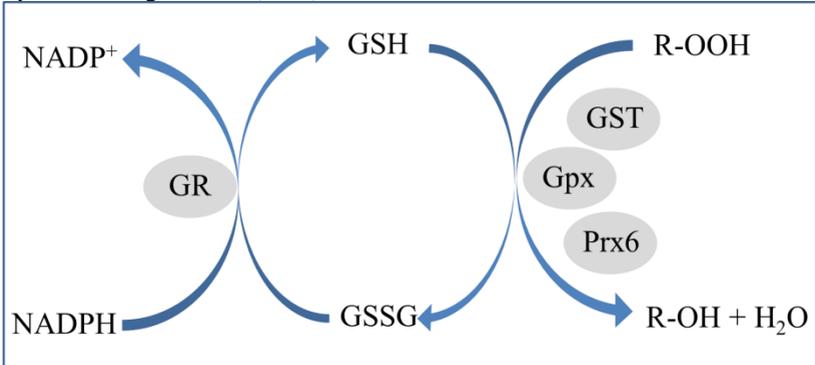
Estão apresentadas também as estruturas da GSH e da butionina sulfoxamina (BSO), inibidor específico da glutamato-cisteína ligase (GCL), enzima limitante na síntese de GSH. GS – Glutathiona sintase. Em destaque na estrutura do BSO: motivo que se assemelha à estrutura da cisteína (círculo pontilhado), o qual permite a interação deste composto com o sítio de ligação da cisteína na GCL. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A capacidade antioxidante e a reatividade da GSH estão relacionadas ao seu grupo tiol (SH) do resíduo de cisteína (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A GSH tem a capacidade de reagir diretamente com diversas espécies reativas ou radiculares (*e.g.* O₂^{•-}, HO[•], H₂O₂, ácido hipocloroso e peroxinitrito), a qual se oxida gerando o radical tili (GS[•]) (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Normalmente, duas moléculas de GS[•] reagem formando um dissulfeto de glutathiona, comumente chamado de glutathiona oxidada (GSSG). A redução da GSSG, e consequente reciclagem da GSH se dá através da enzima glutathiona redutase (GR), à custa de NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A GR é responsável pela manutenção de elevados níveis de GSH na sua forma reduzida, ou tiólica. A relação GSH/GSSG deve ser rigorosamente controlada a fim de manter o ambiente redutor intracelular (regulação do estado redox), evitando o estresse oxidativo, e garantindo, portanto, o correto funcionamento e sobrevivência das células (DEPONTE, 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Sob condições fisiológicas, os níveis de GSSG são menores do que 1 % em relação à concentração total de GSH intracelular, sendo que o acúmulo de GSSG nas células é capaz de ativar vias de sinalização que induzem a

apoptose (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009). A manutenção do ambiente redutor intracelular também é fundamental na proteção dos tióis de proteínas (PSH), impedindo sua oxidação. Os PSH são bastante sensíveis a alterações redox, podendo ser oxidados a radical tili (PS[•]), dissulfetos intra e intermoleculares, ácido sulfênico (SOH), sulfínico (SO₂H) e sulfônico (SO₃H), etc. A GSH pode agir tanto na proteção destes eventos de oxidação dos PSH, quanto em sua reparação (DOMAZOU et al., 2014). Por exemplo, um dos mecanismos de proteção dos PSH é a formação de pontes dissulfeto entre a GSH e a proteína, processo chamado de glutationilação, evitando assim danos irreversíveis (DALLE-DONNE et al., 2007).

A participação da GSH na eliminação de peróxidos pelos sistemas biológicos se dá através das enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e peroxiredoxina 6 (Prx-6) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Diversas outras enzimas possuem atividade peroxidática, que consiste na capacidade de usar um peróxido (R-OOH) para oxidar outro substrato, porém será dado enfoque nas enzimas acima citadas, as quais utilizam a GSH como substrato a ser oxidado aos seu dissulfeto (GSSG). A GPx é uma selenoproteína, sendo o selênio componente importante do sítio ativo desta enzima, o qual se apresenta na forma de selenocisteína. Esta enzima é capaz de reduzir tanto hidroperóxidos orgânicos quanto o H₂O₂ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A GST, apesar de ser classicamente conhecida por seu papel na detoxificação de compostos eletrofílicos (o qual será discutido posteriormente), também apresenta atividade peroxidática contra hidroperóxidos orgânicos (mas não H₂O₂), apesar de não ser uma selenoproteína (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A Prx6, outra peroxidase independente de selênio, corresponde a uma isoforma da família das Prxs que contém apenas uma cisteína em sua estrutura (1-cis-Prx), enquanto que as outras isoformas possuem duas cisteínas (2-cis-Prx). Esta característica confere à Prx6 a sua dependência de GSH, sendo que as 2-cis-Prxs dependem da Trx como agente redutor (o que também será discutido com mais detalhes em seguida) (ARNÉR; HOLMGREN, 2000). Estas três classes de enzimas utilizam a GSH como doadora de elétrons para reduzir os peróxidos à água (H₂O), no caso do H₂O₂ (à exceção da GST), ou a alcoóis (R-OH) e H₂O, no caso de hidroperóxidos orgânicos, gerando GSSG no processo. Como mencionado anteriormente, a GSSG é reduzida pela GR, reestabelecendo os níveis de GSH (Fig. 7) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

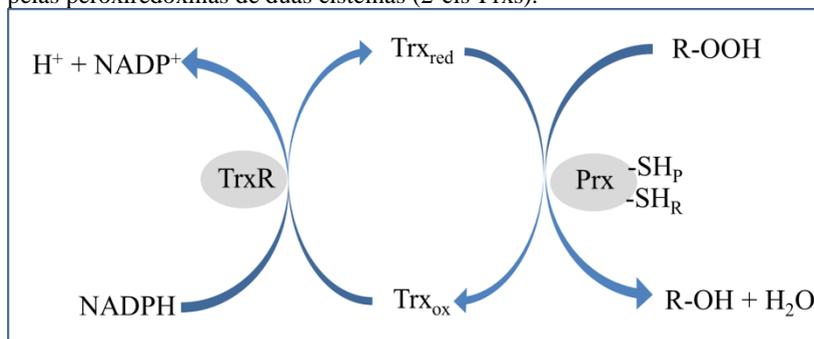
Figura 7. Esquema representando o sistema de detoxificação de hidroperóxidos dependente de glutatona (GSH).



O grupo funcional (R-) pode ser tanto uma cadeia de hidrocarbonetos (hidroperóxidos orgânicos) quanto um hidrogênio (H₂O₂), os quais são substratos para as enzimas glutatona peroxidase (Gpx) e peroxiredoxina 6 (Prx6). No caso da glutatona S-transferase (GST), o R-OOH representa apenas hidroperóxidos orgânicos. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A eliminação de hidroperóxidos orgânicos e H₂O₂ também pode ser realizada por uma família de enzimas conhecidas como peroxiredoxinas (Prxs), as quais foram descobertas apenas recentemente em comparação às outras enzimas antioxidantes (NORDBERG; ARNÉR, 2001). De modo geral, a redução de hidroperóxidos pelas Prxs é independente de GSH, à exceção da Prx6. Durante a redução dos hidroperóxidos, uma das cisteínas (cisteína peroxidática) das 2-cis-Prxs é oxidada formando um ácido sulfênico (Cis-SOH), o qual posteriormente reage com a outra cisteína (cisteína de resolução) presente em sua estrutura, formando uma ponte dissulfeto. A Trx, uma proteína que também contém dois grupos tiólicos, é então utilizada na redução das 2-cis-Prxs oxidadas. Neste processo, a Trx se oxida formando um dissulfeto intramolecular, devendo ser constantemente reciclada para o funcionamento correto do sistema peroxidático, o qual é realizado pela tioredoxina redutase (TrxR), à custa de NADPH (Fig. 8) (ARNÉR; HOLMGREN, 2000). Assim como a GSH, a Trx também participa de outros processos biológicos como: síntese de DNA, redução de dissulfetos em proteínas, reparo em proteínas, regulação da fotossíntese em plantas, regulação redox de fatores de transcrição, entre outros (ARNÉR; HOLMGREN, 2000).

Figura 8. Esquema representando o sistema de detoxificação de hidroperóxidos pelas peroxidoredoxinas de duas cisteínas (2-cis-Prxs).



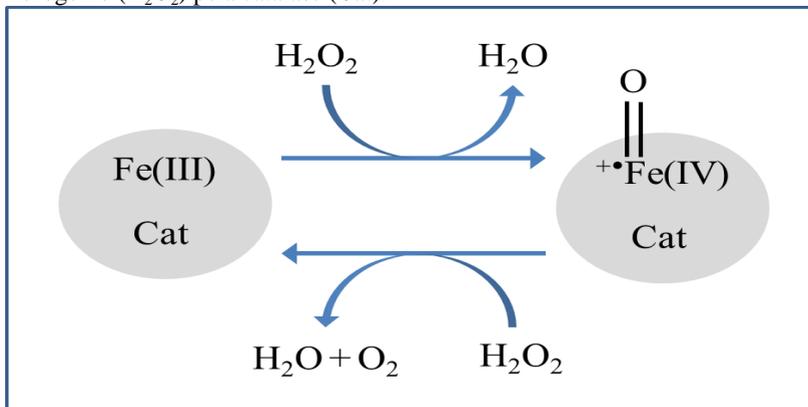
O grupo funcional (R-) pode ser tanto uma cadeia de hidrocarbonetos (hidroperóxidos orgânicos) quanto um hidrogênio (H_2O_2). $-SH_P$ representa a cisteína peroxidática e SH_R representa a cisteína de resolução das 2-cis-Prxs. Trx_{red} – forma reduzida da tiorredoxina (Trx); Trx_{ox} – forma oxidada da Trx. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A catalase (Cat) é outra enzima capaz de detoxificar o H_2O_2 de forma independente de GSH, porém não detoxifica peróxidos orgânicos. Esta enzima catalisa a dismutação do H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular (O_2). A Cat dos eucariotos contém um grupo prostético hemo (contendo ferro) em seu sítio ativo. É um homotetrâmero, sendo que cada uma das subunidades contém um grupo hemo. Durante a reação de dismutação do H_2O_2 , uma primeira molécula de H_2O_2 é reduzida a H_2O , através da oxidação do seu grupo $Fe(III)$ -hemo, gerando a forma radicalar $O=Fe(IV)$ -hemo($^{*+}$) o qual é reestabelecido a partir da entrada de uma segunda molécula de H_2O_2 , gerando H_2O e O_2 (Fig. 9) (KIRKMAN; GAETANI, 2007).

A GSH também desempenha um papel central na remoção ou modificação de inúmeros compostos eletrofílicos tanto endógenos, quanto exógenos, sendo estes últimos também conhecidos como xenobiontes (DEPONTE, 2013). Durante este processo, a GSH é conjugada com estes compostos através da ação GST. Durante a reação de conjugação, o grupo SH da GSH reage com os centros eletrofílicos de uma ampla variedade de substratos. A atividade da GST faz parte de via de biotransformação de fase II, em conjunto com reações de sulfatação, glicuronidação, acetilação e metilação. Esta etapa de biotransformação, é portanto, responsável pela diminuição da lipofilicidade e aumento do peso molecular destes compostos,

diminuindo sua toxicidade e facilitando sua excreção. Desta forma, as GSTs participam da proteção dos centros nucleofílicos de biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos contra o ataque de xenobíóticos (DEPONTE, 2013).

Figura 9. Esquema representando o sistema de detoxificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela catalase (Cat).

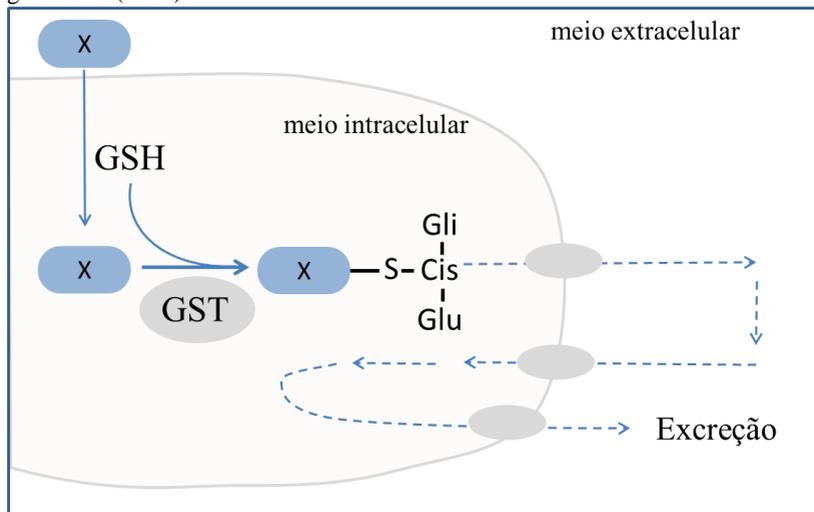


O Fe(III) da primeira metade da reação representa a forma férrica do ferro do grupo hemo, enquanto que $^+\bullet\text{Fe(IV)}$ representa a forma radicalar, intermediária da reação. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Os conjugados de GSH são metabolizados para serem posteriormente excretados pela via do ácido mercaptúrico. Um substrato modelo, tradicionalmente utilizado para avaliar a atividade GST (substrato universal) e a via do ácido mercaptúrico em mamíferos, é o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (DEPONTE, 2013). Neste modelo, o CDNB é conjugado intracelularmente com GSH, gerando o composto 2,4-dinitrofenil-glutaciona. Este composto posteriormente sofre a ação de diversas enzimas que participam da via do ácido mercaptúrico, podendo então ser excretado pelo organismo (Fig. 10) (HINCHMAN; BALLATORI, 1994). O CDNB também tem sido utilizado em mamíferos como um agente perturbador do sistema antioxidante, uma vez que sua metabolização promove a depleção dos níveis de GSH, sendo também capaz de inibir a TrxR (SEYFRIED; WÜLLNER, 2007). Este composto promove distúrbios tanto nos sistemas da GSH quanto da Trx, podendo ser utilizado para compreender a importância destes sistemas em diferentes aspectos do metabolismo e função celular (PADGAONKAR et al., 2014). O CDNB já foi utilizado em estudos com bivalves, sendo que além destes efeitos, também promoveu a

diminuição da atividade GR (MELLO et al., 2015; TREVISAN et al., 2012, 2014).

Figura 10. Esquema representando a conjugação de xenobíoticos com a glutatona (GSH).



X – representa compostos eletrofilicos, como por exemplo o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), o qual pode atravessar a membrana plasmática. Dentro das células o CDNB é conjugado com a GSH pela ação da enzima glutationa S-transferase (GST). O conjugado é então transportado para fora da célula, onde sofre a ação de ectopeptidases. Depois, é transportado de volta para a célula (podendo ser uma célula de outro tecido), onde participa de mais uma reação, formando um composto com maior peso molecular e hidrofobicidade, o qual pode ser posteriormente excretado. Este conjunto de reações participa da chamada “via do ácido mercaptúrico”. Os aminoácidos que compõem a GSH estão representados (Gli – glicina; Cis – cisteína; Glu – glutamato), assim como a molécula de enxofre da Cis (S). Fonte: elaborado pelo próprio autor.

1.5 A importância de se estudar os sistemas de defesa de bivalves

A sobrevivência das ostras é de grande interesse tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico, o que justifica a importância de estudos básicos que contribuem com o conhecimento de mecanismos de defesa nesse grupo de animais. Entretanto, no que diz respeito ao sistema antioxidante, a maior parte do conhecimento que se tem atualmente advém de organismos modelo, como mamíferos e leveduras. No entanto, este sistema está presente de forma ubíquota entre os seres

vivos, incluindo procariontes e plantas (FOYER; NOCTOR, 2005), apesar de pequenas diferenças de mecanismos e estrutura de algumas moléculas. Apesar dos bivalves não serem modelos clássicos para estudos bioquímicos relacionados aos sistemas antioxidante e imune, estes animais estão constantemente sujeitos a desafios pró-oxidantes e patogênicos no ambiente marinho. Desta forma, o correto funcionamento desses sistemas está intimamente relacionado à sobrevivência dos bivalves tanto em seu habitat natural, quanto em cultivos.

A homeostase redox garante às células uma resposta adequada a estímulos internos e externos, porém, quando é perturbada, o estresse oxidativo pode levar à morte celular e/ou contribuir com o desenvolvimento de doenças (HAYES; MCLELLAN, 1999). Sendo assim, distúrbios em parâmetros antioxidantes dos organismos podem influenciar as respostas imunológicas, o que pode caracterizar uma possível relação entre os sistemas antioxidante e imune. Além disso, como discutido anteriormente, as defesas antioxidantes podem ser particularmente importantes em respostas específicas do sistema imune como a destruição de microrganismos dependente de ERO durante a fagocitose. No entanto, apesar de mais evidentes, estas relações não correspondem aos únicos vínculos possíveis entre os sistemas imune e antioxidante. Vários estudos vêm demonstrando que moléculas tipicamente pertencentes ao sistema antioxidante podem participar diretamente de mecanismos de resposta imune. Entre estes pode-se citar: regulação de produção de citocinas (HADDAD; HARB, 2005), regulação de fatores de transcrição associados à resposta imune (PINEDA-MOLINA et al., 2001), diferenciação e atividade fagocítica de macrófagos (KIM et al., 2004), proliferação de esplenócitos (ABDALLA et al., 2011), função de linfócitos (DRÖGE; BREITKREUTZ, 2007; DRÖGE et al., 1994), ativação do “burst” oxidativo e liberação de “armadilhas” de DNA para o meio extracelular em neutrófilos (YAN et al., 2012), entre outros. Contudo, em bivalves a informação disponível é bastante limitada, sendo que a importância de parâmetros associados ao sistema antioxidante para as respostas imunológicas é praticamente desconhecida. Sendo assim, a maior parte do presente trabalho focou em avaliar a importância de tiol redutases e manutenção dos níveis de GSH para a função dos hemócitos e sobrevivência de ostras desafiadas com agentes pró-oxidantes e bactérias.

1.6 Objetivo geral do presente trabalho

Investigara presença de potenciais patógenos de bivalves e uma possível interrelação entre os mecanismos de defesa imune e antioxidante de ostras.

1.7 Objetivos específicos

Estudo 1 – Investigar a presença de potenciais patógenos de ostras em Santa Catarina

- ✓ Investigar, através de técnicas de biologia molecular, a presença de potenciais patógenos de bivalves (OsHV-1, *V. splendidus* e *V. aestuarianus*) em ostras do Pacífico (*C. gigas*) e nativas (*C. gasar*).

Estudo 2 – Determinar os efeitos do composto eletrofílico CDNB sobre a função de hemócitos de ostras do Pacífico

- ✓ Determinar os efeitos do CDNB na viabilidade, níveis de GSH e PSH, assim como na atividade das enzimas GR e TrxR de hemócitos de ostras do Pacífico (*C. gigas*) após exposição *in vitro*;
- ✓ Determinar os efeitos do CDNB na capacidade de adesão, fagocitose e produção de ERO de hemócitos após exposição *in vitro*.

Estudo 3 – Determinar os efeitos da depleção da GSH na função de hemócitos e na sobrevivência de ostras do Pacífico mediante desafios oxidativos ou bacterianos

- ✓ Estabelecer condições experimentais ideais, através de tratamento *in vivo* com um inibidor da síntese de GSH, o BSO, a fim de diminuir os níveis de GSH em tecidos de ostras do Pacífico (*C. gigas*);
- ✓ Determinar os efeitos da depleção de GSH induzido pelo tratamento com BSO sobre:

- a contagem total e diferencial, viabilidade, capacidade de adesão e fagocitose de hemócitos após exposição *in vivo*;
- a taxa de sobrevivência de ostras expostas a peróxidos;
- a taxa de sobrevivência de ostras expostas a cinco diferentes espécies de víbrios.

CAPÍTULO 2 - INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE POTENCIAIS PATÓGENOS DE OSTRAS EM SANTA CATARINA

2.1 Materiais e métodos

2.1.1 Coleta dos animais

Ostras adultas das espécies *Crassostrea gigas* e *C. gasar*(=*C. brasiliiana*) foram obtidas de cinco diferentes locais ao longo da costa de Santa Catarina (Fig. 11). Em cada local e a cada coleta, 30 animais foram randomicamente selecionados em cultivos ou em costão. As coletas foram feitas nos seguintes meses: janeiro, março, agosto e dezembro de 2013 e março e agosto de 2014. As coletas foram feitas em duas localidades do município de Florianópolis (Ribeirão da Ilha - 27°29'S, 48°32'O - e Sambaqui - 27°75'S, 48°57'O), e em uma localidade de cada um dos seguintes municípios: Palhoça (26°87'S, 48°59'O), Biguaçu (27°53'S, 48°62'O) e Balneário Barra do Sul (26°32'S, 48°66'O). Ostras *C. gigas* foram coletadas em todas as localidades, exceto em Balneário Barra do Sul, onde estas não estavam sendo cultivadas no local selecionado para coleta. Ostras *C. gasar* foram encontradas apenas em Sambaqui e Balneário Barra do Sul. Ao todo, foram coletados 720 indivíduos da espécie *C. gigas* e 353 indivíduos da espécie *C. gasar*, os quais foram transportados diretamente ao Núcleo de Estudos em Patologias Aquícolas, no Laboratório de Malacologia Experimental, da Universidade Federal de Santa Catarina, para processamento das amostras. A Tabela 2 apresenta dados referentes a algumas condições da água do mar durante as coletas, os quais foram obtidos através da Fundação do Meio Ambiente (FATMA, 2016), órgão ambiental do estado de Santa Catarina.

Figura 11. Locais de coleta de ostras em Santa Catarina, Brasil.

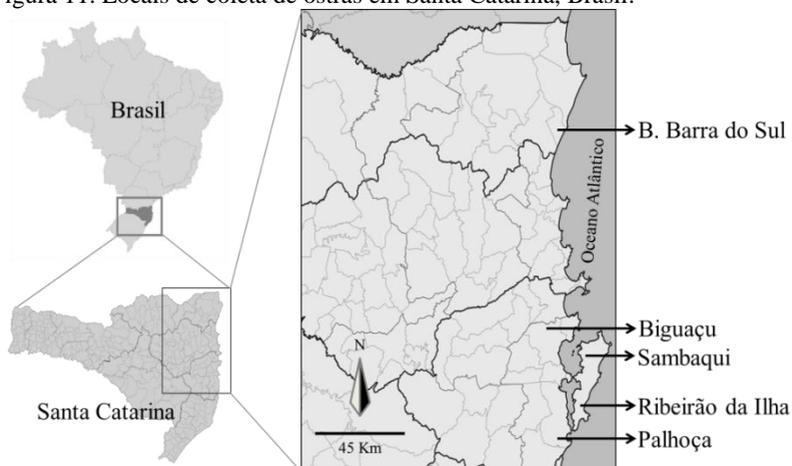


Tabela 2. Parâmetros referentes à água do mar.

Local	Data (coleta de ostras)	Data (análise da água)	T (°C)	coliformes*
Ribeirão da Ilha	15/01/2013	14/01/2013	23	300
	18/03/2013	18/03/2013	20	230
	21/08/2013	06/08/2013	16	230
	12/12/2013	09/12/2013	24	300
	27/03/2014	27/03/2014	25	300
	14/08/2014	14/08/2014	12	122
Sambaqui	16/01/2013	17/01/2013	24	500
	20/03/2013	19/03/2013	22	500
	19/08/2013	14/08/2013	14	500
	11/12/2013	09/12/2013	22	230
	26/03/2014	31/03/2014	25	230
	13/08/2014	27/08/2014	17	106
Palhoça	15/01/2013	17/01/2013	23	230
	19/03/2013	21/03/2013	20	5000
	21/08/2013	13/08/2013	17	300
	12/12/2013	12/12/2013	20	300

	27/03/2014	26/03/2014	25	500
	14/08/2014	26/08/2014	18	211
Balneário Barra do Sul	18/01/2013	16/01/2013	25	230
	21/03/2013	20/03/2013	22	9000
	20/08/2013	27/08/2013	18	800
	10/12/2013	03/12/2013	25	64,1
	25/03/2014	26/03/2014	26	230
	12/08/2014	29/07/2014	19	399
Biguaçu	17/01/2013	14/01/2013	24	300
	22/03/2013	21/03/2013	22	400
	19/08/2013	15/08/2013	16	230
	10/12/2013	12/12/2013	22	230
	25/03/2014	27/03/2014	24	1300
	12/08/2014	12/08/2014	16	1112

Os dados de temperatura, concentração de coliformes e condição da água do mar foram cedidos pela FATMA. Os dados são referentes aos locais e as datas mais próximos possíveis aos de coleta deste estudo. *NMP/100 mL(NMP– número mais provável de *Escherichia coli*). Fonte: FATMA (2016).

2.1.2 Coleta de tecidos

As amostras de tecidos de cerca de 5 mm² de brânquia e glândula digestiva foram coletadas na forma de *pools* de 5 animais (n = 6), e posteriormente armazenadas a -80 °C. Os materiais utilizados foram esterilizados em estufa, a 200 °C por no mínimo 2 h, ou através da queima dos materiais utilizando-se de um bico de Bunsen. Estes procedimentos visaram evitar contaminação cruzada das amostras.

2.1.3 Extração de DNA e condições da PCR

Foram coletadas amostras de DNA genômico a partir dos *pools* de tecidos de ostras. Estes foram picotados com o auxílio de lâminas de bisturi estéreis, sendo utilizado cerca de 25 mg de tecido para extração de DNA genômico com o produto comercial DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, as

amostras de DNA foram submetidas à leitura da sua absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm a fim de verificar a sua concentração e pureza (razões 260/280 e 260/230). Em seguida, 500 ng de cada amostra foi destinado à eletroforese em gel de agarose 1 %, a fim de verificar a integridade do DNA. O gel foi visualizado na presença de brometo de etídeo em um transiluminador UV. As amostras foram então analisadas por PCR em Tempo Real (qPCR) para a investigação molecular da presença dos diferentes patógenos de interesse (vírus OsHV-1 e bactérias *Vibrio splendidus* e *V. aestuarianus*) utilizando, primeiramente, os pares de iniciadores C9/C10, VTS/VS, VSPN-F/VSPN-R e AesF1/AesR1 descritos na Tabela 3. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de DNA extraído de ostras contaminadas com os diferentes patógenos (*V. aestuarianus* 02/41, *V. splendidus*(= *V. tasmaniensis*) LGP32 e OsHV-1 μ Var), gentilmente cedidas pela Dra. Caroline Montagnani (*Mécanismes d'Interaction et d'Adaptation en Milieu Marin*, Universidade de Montpellier II, França). As qPCRs foram realizadas utilizando o reagente *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, e o sistema de detecção ABI 7900HT (Applied Biosystems). Em cada reação foi adicionado 200-500 ng de DNA de uma dada amostra. A amplificação ocorreu através de uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. Análises das curvas de fusão foram realizadas ao final da etapa de amplificação e a temperatura de fusão (Tm) dos produtos de PCR foram avaliados e comparados aos dos controles positivos. A fim de confirmar se os picos observados pelas curvas de fusão representavam o produto de tamanho esperado, algumas amostras que apresentaram uma Tm igual ou próxima à Tm do controle positivo foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1 %. O gel foi visualizado na presença de brometo de etídeo em um transiluminador UV. Foram realizadas ainda PCRs tradicionais com os pares de iniciadores C2/C6, OsHVDP-For/OsHVDP-Rev, Gp3/Gp4, a fim de validar a detecção do OsHV-1. O par de iniciadores GAPDH-like F/GAPDH-like R, capaz de amplificar o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH-like*) tanto de ostras *C. gigas* quanto de *C. gasar*, também foi utilizado como controle interno a fim de verificar a presença de inibidores nas amostras. As PCRs tradicionais foram realizadas utilizando-se o reagente *2X PCR Taq MasterMix* (abm), de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise de cada amostra foi adicionado 200-500 ng de DNA em 1 μ L ao meio de reação. A amplificação ocorreu através de uma etapa inicial de desnaturação a 95

°C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, seguida de uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 %, corados com iodeto de propídeo e visualizados através de um transiluminador UV.

Tabela 3. Lista dos pares de iniciadores utilizados para a investigação molecular dos diferentes patógenos de interesse.

Organismo	Nome	Sequência (5'-3')	pb	Referência
OsHV-1	C9	GAGGGAAATTTGCGAGAGAA	197	Barbosa-Solomieu et al. (2004)
	C10	ATCACCGGCAGACGTAGG		
	C2	CTCTTTACCATGAAGATACCCACC	352	Barbosa-Solomieu et al. (2004)
	C6	GCAGTTGTGGTATACTCGAGATTG		
	OsHVDP-For	ATTGATGATGTGGATAATCTGTG	198	Martenot et al. (2010)
	OsHVDP-Rev	GGTAAATACCATTGGTCTTGTTC		
	Gp3	GGTTGTGGGTTTGGAATGT	698	Batista et al. (2007)
	Gp4	GCGTCCAAACTCGATTA		
<i>V. aestuarianus</i>	AesF1	GTATGAAATTTAACTGACCCACAA	266	Saulnier et al. (2009)
	AesR1	CAATTTCTTTCGAACAACCAC		
<i>V. splendidus</i>	VTS	GAGCGGAAACGACACTAACA	427	Lago et al. (2009)
	VS	AAGAGATAGCGCTATTAACGCT		
	VSPN-F	GATTTAGTTAAAGCCAGAGC	294/	Lee et al. (2002)
	VSPN-R	CCTGATAACTGTTTGCCG	240	
<i>C. gigas</i>	GAPDH-likeF ^a	AAGCAACAAGGATTGGCGTGGT	139	Flores-Nunes et al. (2015)
	GAPDH-likeR ^a	AACTGGTACGCGAAAGCCATT		

As publicações utilizadas como referência para obtenção das sequências de cada iniciador são citadas, assim como o tamanho esperado do produto amplificado.^a par de iniciadores utilizado para amplificação de uma sequência de ostra (controle interno), a fim de investigar a presença de inibidores da PCR na amostra. Este par de iniciadores amplificam o gene GAPDH-like de ostras *C. gigas* e *C. gasar*.

2.1.4 Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento do DNA e alinhamento

Os produtos de PCR foram purificados através do *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram sequenciadas

em ambos os sentidos de leitura (senso e anti-senso) por uma empresa contratada (Eton Bioscience, San Diego, USA) utilizando o sequenciador *ABI 3730xl DNA Sequencer* (Applied Biosystems), juntamente com o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). A nomeação de bases, triagem de vetores e remoção de bases com baixa qualidade foi realizada pela Eton Bioscience com softwares proprietários. O alinhamento das sequências senso e anti-senso foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega (1.2.1) (SIEVERS et al., 2011), e a montagem realizada através do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). As sequências obtidas foram então sujeitas a buscas através do programa BLASTn (2.3.0+)(ALTSCHUL et al., 1997), na coleção de nucleotídeos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). O alinhamento múltiplo das sequências obtidas neste estudo com as sequências detectadas via BLASTn também foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega.

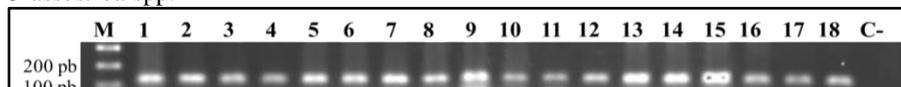
2.2 Resultados

2.2.1 *Vibrio* spp.

A presença dos patógenos *V. splendidus* e *V. aestuarianus* foi investigada em amostras de tecidos de ostras coletadas em diferentes localidades ao longo da costa de Santa Catarina. Análises de qPCR foram realizadas com amostras de DNA extraído de brânquias e glândulas digestivas de ostras nativas e japonesas, utilizando-se os pares de iniciadores VTS/VS, VSPN-F/VSPN-R e AesF1/AesR1.

Não foram encontradas amostras que apresentassem amplificação utilizando-se o iniciador AesF1/AesR1, o qual permite a detecção de *V. aestuarianus*. O controle positivo, por sua vez, apresentou um produto de ~300 pb, próximo ao tamanho esperado (266 pb) (dados não apresentados). Esta falta de amplificação provavelmente não se deu devido à presença de inibidores da PCR nas amostras de estudo (falsos negativos), uma vez que a amplificação da sequência correspondente ao gene *GAPDH-like* de ostras ocorreu em todas as amostras que foram analisadas com o par de iniciadores GAPDH-like-F/GAPDH-like-R (Fig. 12).

Figura 12. Amplificação de uma sequência pertencente ao genoma de ostras *Crassostrea* spp.



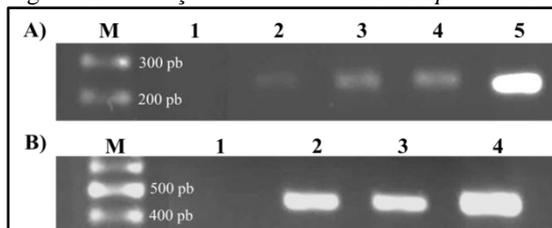
O par de iniciadores GAPDH-like-F/GAPDH-like-R capaz de amplificar o gene correspondente à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH-like*) de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) e nativas (*C. gasar*) foi usado em amostras de DNA de ostras coletadas em diferentes locais de Santa Catarina, através de reações de PCR convencional. M = Marcador de tamanho do fragmento de DNA de 100 pb; 1 a 18 - amostras aleatórias de DNA de tecidos de ostras coletadas em diferentes locais de Santa Catarina; C - reação de amplificação sem adição de amostras de DNA (controle negativo).

Algumas amostras apresentaram amplificação de produtos de qPCR em presença dos pares de iniciadores VSPN-F/R e VTS/VS, ambos destinados à detecção da espécie *V. splendidus*. Análises de qPCR utilizando as amostras de controle positivo revelaram produtos com Tm de 79,1 °C e 77,2 °C para os iniciadores VSPN-F/R e VTS/VS, respectivamente (Anexo A; Figs. 1A e 1B). Algumas amostras que apresentaram amplificação com ambos os iniciadores e que apresentaram um Tm similar ao do controle positivo foram destinadas à eletroforese em gel de agarose e são mostradas na Figura 13. Foram observadas, portanto, amostras positivas, ou seja, que apresentaram produtos de PCR com um tamanho próximo ao esperado para ambos os iniciadores utilizados, indicando a presença de *V. splendidus*.

Foram então selecionadas duas amostras positivas (uma para cada um dos pares de iniciadores), as quais foram purificadas e posteriormente enviadas para sequenciamento em ambos os sentidos de leitura (senso e anti-senso). Análises de alinhamento das sequências obtidas com os iniciadores VSPN-F e VSPN-R revelaram que estas não foram totalmente complementares (apenas 52 % de identidade), provavelmente devido à baixa qualidade das amostras enviadas para o sequenciamento (Anexo B, Fig. 1). Já as sequências obtidas com os iniciadores VTS e VS apresentaram uma alta complementaridade (93 % de identidade), possibilitando a montagem destas em uma sequência única (Anexo B, Fig. 2). Mesmo apresentando uma baixa qualidade, as sequências obtidas com os iniciadores VSPN-F e VSPN-R apresentaram 78 e 79 % de identidade com uma sequência pertencente à espécie *V. splendidus* cepa ATCC 33125, respectivamente. As sequências também apresentaram 92 e 78 % de identidade com uma sequência pertencente à espécie *V. splendidus* cepa LGP32, respectivamente (Anexo B; Figs. 3 a

6; Anexo C; Tabela 1). Enquanto que a sequência obtida com o par de iniciadores VTS/VS apresentou 98 % de identidade com várias espécies de *Vibrio*, incluindo algumas cepas de *V. splendidus* (Anexo B; Fig. 7; Anexo C; Tabela 1). Desta forma, os dados de prevalência do *V. splendidus*, são referentes ao par de iniciadores VSPN-F/VSPN-R, uma vez que não foi possível identificar qual espécie de *Vibrio* foi detectada com o par de iniciadores VTS/VS.

Figura 13. Detecção molecular de *Vibrio splendidus*.



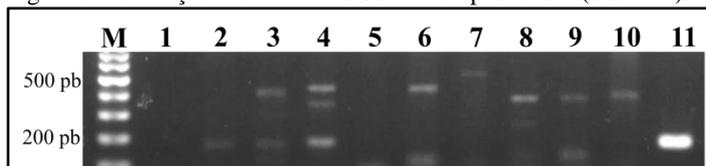
Foram realizadas reações de qPCR e os produtos separados por eletroforese em gel de agarose. (A) Par de iniciadores VSPN-F/VSPN-R: M = Marcador de tamanho do fragmento de DNA de 100 pb, 1= controle negativo, 2-4= amostras de DNA extraídos de tecidos de ostras de diferentes locais de Santa Catarina que apresentaram amplificação, 5= controle positivo (amostras de DNA extraído de ostras infectadas com *V. splendidus*). B) Par de iniciadores VTS/VS: 1= controle negativo, 2 e 3= amostras de DNA extraídos de tecidos de ostras de diferentes locais de Santa Catarina que apresentaram amplificação, 4= controle positivo (amostras de DNA extraído de ostras infectadas com *V. splendidus*).

2.2.2 *OsHV-1*

A presença do vírus OsHV-1 também foi investigada em amostras de DNA extraído de brânquias e glândulas digestivas de ostras coletadas em diferentes locais da costa de Santa Catarina. Análises de qPCR foram realizadas primeiramente com o par de iniciadores C9/C10. Através de análises das curvas de fusão formadas pelos produtos amplificados, no controle positivo foi observado um único pico correspondendo a uma T_m de 81,2 °C, enquanto que as amostras de estudo apresentaram, muitas vezes, mais de um pico, os quais

apresentaram T_m variando entre 70,9 e 81,9 °C (Anexo A; Fig. 1C). Algumas amostras que apresentaram ao menos um pico com T_m semelhante ao do controle positivo foram posteriormente submetidas à separação por eletroforese em gel de agarose. Foi observado que algumas amostras apresentaram ao menos um produto de tamanho esperado (~200 pb) juntamente com produtos de outros tamanhos, enquanto que em outras amostras foram amplificados apenas produtos de tamanho diferente do previsto (Fig. 14).

Figura 14. Detecção molecular do Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1).



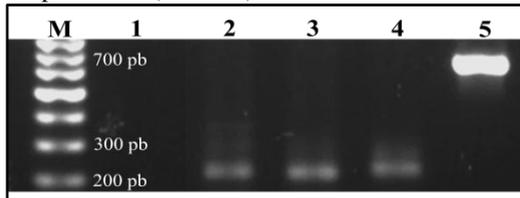
Foram realizadas reações de qPCR com o par de iniciadores C9/C10 e os produtos separados por eletroforese em gel de agarose. M = Marcador de tamanho do fragmento de DNA de 100 pb, 1= controle negativo, 2-10= amostras de DNA extraídos de tecidos de ostras de diferentes locais de Santa Catarina que apresentaram amplificação, 11= controle positivo (amostras de DNA extraído de ostras infectadas com OsHV-1).

Algumas amostras que apresentaram amplificação com o par de iniciadores C9/C10 foram analisadas ainda, por PCR convencional, utilizando três outros pares de iniciadores capazes de detectar o OsHV-1: C2/C6, OsHVDP-For/OsHVDP-Rev e Gp3/Gp4. Não foi observada amplificação em nenhuma das amostras analisadas utilizando-se os pares de iniciadores C2/C6 e OsHVDP-For/OsHVDP-Rev, apesar da forte amplificação observada com o controle positivo para ambos os iniciadores (dados não apresentados). Contudo, algumas amostras apresentaram amplificação de um produto de ~200 pb, bem diferente do tamanho esperado (698 pb) (Fig. 15)

O produto de tamanho esperado (~200 pb) e um outro produto de ~400 pb, ambos obtidos com o par de iniciadores C9/C10, foram purificados e sequenciados, assim como o produto de tamanho não esperado (~200 pb) obtido com o par de iniciadores Gp3/Gp4. Os pares de sequências obtidas (senso e anti-senso) dos produtos de ~200 pb e ~400 pb obtidos utilizando o par de iniciadores C9/C10 não puderam ser montadas em uma sequência única. A identidade entre as fitas senso e anti-senso do produto de ~200 pb foi de 47 %, enquanto que a do

produto de ~400 pb foi de 74 % (Anexo B; Figs. 8 e 9). Novamente, isto provavelmente se deu devido à baixa qualidade das amostras, aparentando haver contaminação com mais de uma sequência. Já as sequências obtidas com os iniciadores Gp3 e Gp4 apresentaram uma identidade maior (78 %), possibilitando a montagem destas em uma única sequência (Anexo B, Fig. 10). Mesmo apresentando uma baixa qualidade, as sequências obtidas a partir do produto de ~200 pb, obtida com os iniciadores C9 e C10, apresentaram cerca de 90 % de identidade com uma sequência pertencente ao vírus OsHV-1 (Anexo B; Figs. 11 e 12; Anexo C; Tabela 1). Em contrapartida, as sequências obtidas a partir do produto de ~400 pb apresentaram entre 74 e 77 % de identidade com uma sequência pertencente à própria ostra da espécie *C. gigas* (Anexo B; Figs. 13 e 14; Anexo C; Tabela 1). As amostras apresentando o produto de ~400 pb e que não apresentaram o produto de ~200 pb, não foram consideradas, portanto, como positivas para a coleta dos dados de prevalência. Por fim, a sequência obtida com o par de iniciadores Gp3/Gp4 não alinhou significativamente com nenhuma sequência presente no banco de dados do NCBI (Anexo C; Tabela 1). Sendo assim, as amostras que apresentaram amplificação com este par de iniciadores também não foram consideradas como positivas.

Figura 15. Detecção molecular do Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1).



Foram realizadas reações de PCR convencional com o par de iniciadores Gp3/Gp4 e os produtos separados por eletroforese em gel de agarose com o par de iniciadores. M = Marcador de tamanho do fragmento de DNA de 100 pb, 1= controle negativo, 2-4= amostras de DNA extraídos de tecidos de ostras de diferentes locais de Santa Catarina que apresentaram amplificação, 5= controle positivo (amostras de DNA extraído de ostras infectadas com OsHV-1).

2.2.3 Prevalência de *V. splendidus* e OsHV-1 em Santa Catarina

Muito embora os resultados de investigação molecular, obtidos através das análises de PCR, sequenciamento e alinhamento, não sejam definitivos, estes apresentam fortes evidências da presença da bactéria *V. splendidus* e do vírus OsHV-1 na costa de Santa Catarina. A Tabela 4 resume os locais de coleta e períodos nos quais estes patógenos foram detectados para cada tecido estudado, os quais foram obtidos de ostras do Pacífico e nativas.

A bactéria *V. splendidus* foi detectada em aproximadamente 15 % de todas amostras analisadas, enquanto que o vírus OsHV-1 foi detectado em 28 % das amostras. Esta espécie de *Vibrio* foi detectada apenas na brânquia, enquanto que o vírus foi detectado em ambos os tecidos, apesar de ser encontrado predominantemente na brânquia (88 %). Um dado interessante é que o vírus nunca foi detectado concomitantemente em amostras de brânquia e glândula digestiva pertencentes ao mesmo *pool* de animais.

Ambos os patógenos foram detectados em amostras provenientes de todos os locais de estudo e em ambas espécies de ostras. De modo geral, os locais apresentaram uma prevalência semelhante, que variou entre 11 e 20 % no que se refere ao *V. splendidus* e entre 22 e 36 % no caso do OsHV-1 (Fig. 16A), relativo às amostras coletadas em cada local. Considerando os meses de coleta, separadamente, observou-se que o *V. splendidus* passou a ser detectado a partir de agosto de 2013, apresentando apenas 6 % de prevalência, a qual aumentou consideravelmente (25-31 %) nos meses seguintes (Fig. 16B). De modo semelhante, o vírus OsHV-1 apresentou uma prevalência mais baixa nos três primeiros meses de coleta (8-16 %), aumentando nos meses seguintes (33-53 %). A maior prevalência registrada para cada patógeno foi em março de 2014 (31 e 53 % para *V. splendidus* e OsHV-1, respectivamente). A co-deteção dos patógenos ocorreu em 6,5 % das amostras totais, sendo que em quase metade (44 %) das amostras positivas para o *V. splendidus*, o OsHV-1 também foi detectado, e em 23 % das amostras positivas para o OsHV-1, o DNA de *V. splendidus* também estava presente. Contudo, cabe lembrar que a co-deteção destes patógenos não significa obrigatoriamente que ambos estão presentes no mesmo animal, já que cada amostra foi composta de tecidos de 5 animais.

Tabela 4. Detecção molecular de *Vibrio splendidus* e Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) em ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) e nativas (*C. gasar*) provenientes de diferentes pontos da costa de Santa Catarina.

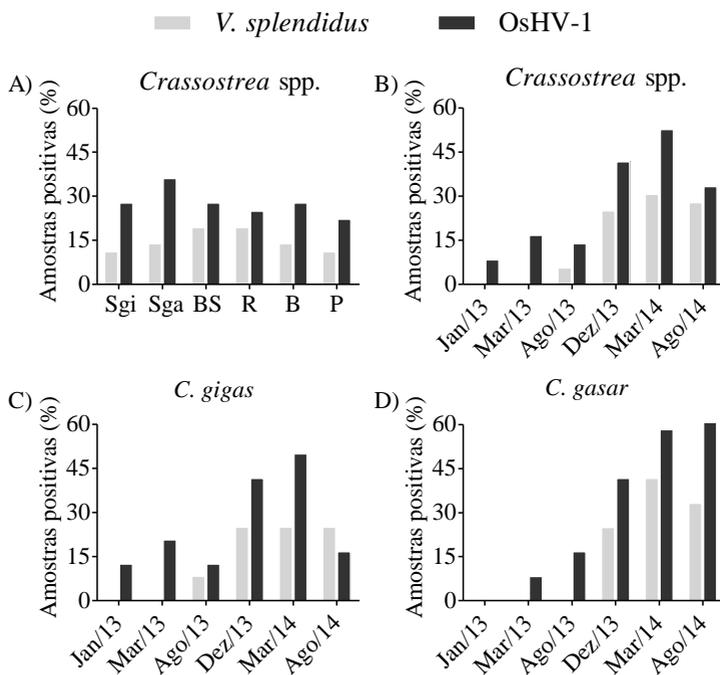
Campanha	Local	Espécie de ostra	V.		Co- detecção	
			<i>splendidus</i> brânquia	OsHV-1 brânquia glândula digestiva		
Jan/2013	Sambaqui	<i>C. gasar</i>	0/6	0/6	0/6	-
	Sambaqui	<i>C. gigas</i>	0/6	1/6	0/6	-
	B. Barra do Sul	<i>C. gasar</i>	0/6	0/6	0/6	-
	Ribeirão da Ilha	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
	Biguaçu	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
	Palhoça	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
Mar/2013	Sambaqui	<i>C. gasar</i>	0/6	0/6	1/6	-
	Sambaqui	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
	B. Barra do Sul	<i>C. gasar</i>	0/6	0/6	0/6	-
	Ribeirão da Ilha	<i>C. gigas</i>	0/6	1/6	0/6	-
	Biguaçu	<i>C. gigas</i>	0/6	4/6	0/6	-
	Palhoça	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
Aug/2013	Sambaqui	<i>C. gasar</i>	0/6	1/6	0/6	-
	Sambaqui	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
	B. Barra do Sul	<i>C. gasar</i>	0/6	1/6	0/6	-
	Ribeirão da Ilha	<i>C. gigas</i>	0/6	2/6	0/6	-
	Biguaçu	<i>C. gigas</i>	0/6	0/6	0/6	-
	Palhoça	<i>C. gigas</i>	2/6	0/6	1/6	-
Dec/2013	Sambaqui	<i>C. gasar</i>	1/6	2/6	0/6	1
	Sambaqui	<i>C. gigas</i>	1/6	2/6	1/6	1
	B. Barra do Sul	<i>C. gasar</i>	2/6	2/6	1/6	1
	Ribeirão da Ilha	<i>C. gigas</i>	2/6	2/6	1/6	1
	Biguaçu	<i>C. gigas</i>	2/6	2/6	0/6	-
	Palhoça	<i>C. gigas</i>	1/6	2/6	0/6	-
Mar/2014	Sambaqui	<i>C. gasar</i>	4/6	4/6	0/6	2
	Sambaqui	<i>C. gigas</i>	1/6	2/6	0/6	1
	B. Barra do Sul ^a	<i>C. gasar</i>	1/5	3/5	0/5	1
	Ribeirão da Ilha	<i>C. gigas</i>	3/6	3/6	0/6	2
	Biguaçu	<i>C. gigas</i>	1/6	2/6	2/6	-
	Palhoça	<i>C. gigas</i>	1/6	3/6	0/6	1
Aug/2014	Sambaqui	<i>C. gasar</i>	0/6	5/6	0/6	-
	Sambaqui	<i>C. gigas</i>	2/6	2/6	0/6	1
	B. Barra do Sul	<i>C. gasar</i>	4/6	3/6	0/6	2
	Ribeirão da Ilha	<i>C. gigas</i>	2/6	0/6	0/6	-
	Biguaçu	<i>C. gigas</i>	2/6	0/6	0/6	-
	Palhoça	<i>C. gigas</i>	0/6	2/6	0/6	-

Cada amostra (n = 6/local/período/espécie/tecido) foi composta de um *pool* de tecido (brânquia ou glândula digestiva) de 5 animais. ^a Ocorrência de uma elevada taxa de mortalidade, relatada por maricultores locais. Apenas 23 indivíduos puderam ser coletados (n= 5, sendo 4 *pools* de 5 animais e 1 *pool* de 3 animais).

Comparando as duas espécies de ostras analisadas, foi observado que a detecção do OsHV-1 em *C. gigas* apresentou uma variação sazonal, com maiores índices de prevalência no verão de 2013/2014 (42-50 %)(Fig. 16C). A detecção do OsHV-1 em *C. gasar*, também apresentou uma maior prevalência neste mesmo período (42-58 %), contudo esta se manteve alta também no inverno seguinte (67 %)(Fig.

16D). Com relação ao *V. splendidus*, este passou a ser detectado nas amostras de *C. gigas* a partir de agosto de 2013 e de *C. gasar* a partir de dezembro de 2013 (Figs. 16C e D), apresentando uma prevalência de modo geral,

Figura 16. Prevalência dos patógenos *Vibrio splendidus* e Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) em ostras coletadas em diferentes períodos e locais ao longo do litoral de Santa Catarina.



(A) – porcentagem de amostras positivas para cada local de coleta: Sgi – Sambaqui (*Crassostrea gigas*); Sga – Sambaqui (*C. gasar*); BS – Balneário Barra do Sul (*C. gasar*); R – Ribeirão da Ilha (*C. gigas*); B – Biguaçu (*C. gigas*); P – Palhoça (*C. gigas*). (B-D) – porcentagem de amostras positivas para cada período de coleta, referente a amostras de ambas as espécies contabilizadas (B) juntas ou (C e D) separadamente.

2.3 Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de uma espécie de vírus e duas espécies de bactérias potencialmente patogênicos a

ostras em áreas de cultivo do litoral catarinense. Este foi um estudo de caráter pioneiro, uma vez que, até a presente data, apenas vírus e bactérias patogênicos para seres humanos haviam sido investigados em bivalves no Brasil (LEAL DIEGO et al., 2013; RAMOS et al., 2014; RISTORI et al., 2007; SINCERO et al., 2006; SOUZA et al., 2012). Neste estudo, nós utilizamos a técnica de qPCR, mais rápida do que a PCR tradicional, para realizar uma triagem das amostras, buscando possíveis amostras positivas. Posteriormente, apenas algumas amostras de interesse foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para confirmação do tamanho dos produtos de amplificação obtidos. Posteriores análises de sequenciamento revelaram a primeira evidência da presença da bactéria *V. splendidus* e do vírus OsHV-1 no Brasil.

Todos os iniciadores utilizados neste estudo foram previamente validados em estudos anteriores (BATISTA et al., 2007; LAGO; NIETO; FARTO SEGUÍN, 2009; MARTENOT et al., 2010; SAULNIER; DE DECKER; HAFFNER, 2009). A fim de detectar o *V. splendidus*, dois pares de iniciadores foram usados: o VSPN-F/VSPN-R (LEE et al., 2002) e o VTS/VS (LAGO; NIETO; FARTO SEGUÍN, 2009). De acordo com Lee et al. (2002), VSPN-F/VSPN-R é um par de iniciador específico para esta espécie, uma vez que foi testado com DNA extraído de diversas outras espécies do mesmo gênero e de gêneros diferentes. Ademais, eles relatam a obtenção de dois produtos de amplificação com estes iniciadores, sendo um de 240 pb e outro de 294 pb. No presente trabalho, contudo, foi observado apenas um produto de aproximadamente 250 pb, tanto com as amostras coletadas neste estudo, quanto com o controle positivo. Embora não tenha sido possível identificar a cepa de *V. splendidus* detectada neste estudo, sabe-se que a cepa utilizada para obtenção do controle positivo foi diferente da usada por Lee et al. (2002). Como mencionado anteriormente (seção 3.1.3), o controle positivo foi obtido a partir de ostras contaminadas com a cepa *V. splendidus* LGP32 (= *V. tasmaniensis* LGP32), isolada da França (GAY; BERTHE; LE ROUX, 2004), enquanto que a cepa utilizada por Lee et al. (2002) foi *V. splendidus* ATCC 33125, isolada da Holanda (BULLER, 2014). Sendo assim, possivelmente, esta diferença com relação aos produtos amplificados por esse par de iniciadores se deu devido a diferenças entre as cepas em questão.

Já o par de iniciadores VTS/VS é capaz de amplificar outras espécies além de *V. splendidus*, mas filogeneticamente muito próximas como: *V. crassostreae*, *V. kanaloae*, *V. lentus*, *V. pomeroyi* e *V. tasmaniensis* (LAGO; NIETO; FARTO SEGUÍN, 2009). Neste estudo, foram observadas amostras que apresentaram amplificação com este par

de iniciadores, mas não quando o par VSPN-F/VSPN-R foi utilizado. Uma vez que este último seria específico para *V. splendidus*, é possível que algumas destas outras espécies correlatas, também estejam presentes na costa de Santa Catarina.

Quatro pares de iniciadores diferentes foram utilizados para investigar a presença do vírus OsHV-1: C9/C10, Gp3/Gp4, C2/C6 e OsHVDP-For/OsHVDP-Rev. Apenas o par C9/C10 foi capaz de amplificar um produto que apresentou o tamanho esperado (~200 bp), o qual, após sequenciamento, apresentou alta identidade com sequências de OsHV-1 depositadas no NCBI. Apesar desta forte evidência da presença deste vírus na costa de Santa Catarina, estudos futuros são necessário para a confirmação com outros métodos de detecção (e.g. microscopia eletrônica ou hibridização *in situ*). A ausência de amplificação quando os outros iniciadores foram utilizados, os quais também são específicos para OsHV-1, pode ser explicada devido à maior eficiência e sensibilidade do par de iniciadores C9/C10, a qual já foi demonstrada anteriormente (PEPIN; RIOU; RENAULT, 2008). Esta maior sensibilidade se deve ao fato da porção do genoma do vírus (a qual se encontra na região denominada “C”) utilizada para a seleção desse par, apresentar-se duplicada. Contudo, esta região pode ser variável, já que foram relatados polimorfismos em sua sequência (PEPIN; RIOU; RENAULT, 2008), o que poderia justificar o aparecimento de produtos com tamanhos diferentes do esperado, como os observados neste estudo. A ocorrência de produtos inespecíficos, utilizando o par de iniciadores C9/C10, também já foi relatada (BATISTA et al., 2007), contudo este é o primeiro estudo a demonstrar que este par é capaz de amplificar uma sequência pertencente à ostra *C. gigas*.

Nas últimas décadas, o vírus OsHV-1 e a bactéria *V. splendidus* têm sido frequentemente detectados em amostras de ostras durante episódios de mortalidade (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; TRAVERS et al., 2015). O presente trabalho aponta para a presença destes dois patógenos ao longo de boa parte do litoral catarinense, uma vez que o DNA de ambos foi detectado em todos os locais de estudo. Contudo, mortalidades massivas de ostras da magnitude como tem ocorrido na Europa, onde em algumas regiões as perdas chegaram a 100 % (PERNET et al., 2012), por exemplo, são raras no Brasil. Durante o período deste estudo, em março de 2014, ocorreu um evento de mortalidade expressiva de ostras *C. gasar* em Balneário Barra do Sul, de acordo com alguns produtores locais. Inclusive, não foi possível realizar a coleta de ostras nos cultivos, as

quais somente foram amostradas de ambiente naturais, em costões próximos ao local de cultivo. Fora este, não temos conhecimento de nenhum outro evento de mortalidade de ostras em Santa Catarina durante o período deste estudo. Apesar de não ser possível afirmar se os patógenos detectados estão associados a este evento de mortalidade, esta possibilidade também não está descartada. Contudo, acredita-se que outros fatores também estariam envolvidos, como a presença de outros patógenos não investigados por este estudo ou de fatores ambientais que poderiam ter aumentado a susceptibilidade das ostras a infecções. De fato, acredita-se que as mortalidades massivas de ostras que vêm ocorrendo nas outras partes do mundo não se deva a um fator isolado, mas a um conjunto de fatores como: a predisposição genética dos animais, seu estado fisiológico, a presença de microrganismos patogênicos e outros fatores de estresse como, por exemplo, a elevação da temperatura da água e a presença de contaminantes ambientais (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; EFSA AHAW PANEL, 2015; ROMALDE; BARJA, 2010). Apesar de não existir um estudo mais amplo, buscando as possíveis causas da mortalidade de *C. gasar* em Balneário Barra do Sul em março de 2014, um estudo feito por outro grupo em paralelo a este, detectou a presença do protozoário *Perkinsus beihaiensis* nesta mesma localidade e período (CUNHA et al., 2016). Cabe acrescentar, que este estudo foi realizado com os mesmos lotes de animais investigados no presente trabalho. Protozoários do gênero *Perkinsus* também têm sido associados a grandes eventos de mortalidades de ostras (VILLALBA et al., 2004). Apesar desta espécie não ser de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), ela já foi associada a lesões nos tecidos de ostras da China (MOSS et al., 2008). Ademais, estes protozoários não foram detectados infectando ostras em nenhuma das outras 4 localidades estudadas, durante o período deste estudo, porém em Balneário Barra do Sul, *P. beihaiensis* foi detectado nas campanhas de janeiro, março e dezembro de 2013, assim como em agosto de 2014 (CUNHA et al., 2016). Sendo assim, existe a possibilidade deste evento de mortalidade estar associado à presença de múltiplos fatores, incluindo a presença deste protozoário, do vírus OsHV-1 e da bactéria *V. splendidus*.

Sabe-se que há mais de uma variante do vírus OsHV-1, assim como diferentes cepas de *V. splendidus*, os quais apresentam níveis de virulência distintos (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; TRAVERS et al., 2015). Dado que mortalidades massivas de ostras não vêm ocorrendo em Santa Catarina nos últimos anos, é

possível que a variante do vírus e cepa da bactéria detectados sejam pouco ou nada virulentos. Não obstante, a sequência obtida com o iniciador VSPN-F apresentou 92 % de identidade com a cepa *V. splendidus* LGP32, posteriormente classificada como *V. tasmaniensis* LGP32 (NASFI et al., 2015; SAWABE et al., 2013). Esta cepa já foi detectada em ostras *C. gigas* durante episódios de mortalidades massivas na França (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; SAWABE et al., 2013). Além disso, esta cepa promoveu 20 % de mortalidade em *C. gigas* através de infecções experimentais, a qual aumentou para 60 % quando injetada juntamente com outras cepas desta mesma espécie (LGP31 ou LGP33) (GAY et al., 2004). Estes resultados demonstram que a associação de diferentes cepas pouco virulentas individualmente pode potencializar as taxas de mortalidade. Este pode ser um dos motivos pelos quais não há registros de mortalidades massivas de ostras na costa de Santa Catarina nos últimos anos, mesmo com a potencial presença de uma cepa de *V. splendidus* que é semelhante a uma cepa associada a mortalidades na Europa. De maneira similar, existem diversas variantes do vírus OsHV-1, as quais apresentam diferentes níveis de patogenicidade (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Algumas variantes já foram detectadas tanto em ostras moribundas, durante episódios de mortalidades, quanto em ostras aparentemente saudáveis (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015), demonstrando que a presença deste vírus pode ocorrer em locais onde não há mortalidades expressivas de ostras, como no caso de Santa Catarina.

O OsHV-1 foi molecularmente detectado em brânquias e glândula digestiva de ostras do Pacífico e nativas, porém com uma maior frequência em brânquias. De fato, os principais órgãos-alvo para os quais partículas virais são direcionadas aparentam ser as brânquias e o manto (BEN-HORIN et al., 2015). Estudos sugerem que as partículas virais de OsHV-1 entram no hospedeiro através da alimentação por filtração e, do trato digestivo, passam para a hemolinfa, onde são transportados pelos hemócitos e então se concentram nesses órgãos onde há naturalmente uma grande infiltração hemocitária (BEN-HORIN et al., 2015). Ali, o vírus se replica e, apenas então, espalha-se para os outros órgãos (BEN-HORIN et al., 2015), como por exemplo a glândula digestiva. Isto explicaria a menor detecção do vírus neste tecido. A bactéria *V. splendidus*, contudo, foi detectada exclusivamente na brânquia. Em bivalves saudáveis os processos digestivos aparentam ser uma importante barreira contra a colonização de bactérias em seus tecidos, servindo inclusive como fonte de alimento (BEN-HORIN et al.,

2015). A dinâmica de infecção por *V. splendidus* em seus hospedeiros ainda não é bem esclarecida, porém, considerando que a digestão possa ser uma defesa eficiente contra este grupo de patógenos, é de se esperar que tecidos que se encontram em contato direto com o ambiente externo sejam mais susceptíveis à colonização bacteriana. De fato, a glândula digestiva não aparenta ser um órgão de preferência para várias bactérias patogênicas (TRAVERS et al., 2015) e, aparentemente, este também pode ser o caso da bactéria *V. splendidus* detectada no presente trabalho.

A importância de estudos de investigação da presença de organismos patogênicos para bivalves reside na possibilidade de se tomar medidas que possam prevenir desastres, a exemplo dos ocorridos em diversos outros países. Isto é particularmente válido para regiões que dependem fortemente destes animais, tanto do ponto de vista econômico, quanto social. Tem sido amplamente discutido por pesquisadores que estas mortalidades massivas de ostras não aparentam ser devido apenas à presença de patógenos, mas também parecem estar fortemente associadas a diferentes fatores de estresse (EFSA, 2010; 2015). Alguns destes fatores podem ser mais facilmente controlados, como por exemplo as práticas de manejo dos bivalves nos sistemas de cultivo. Efetivamente, estudos têm demonstrado que o manuseio, transporte e aglomeração dos animais, assim como a presença de contaminantes estão implicados no desenvolvimento de doenças virais e bacterianas em bivalves (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; GAGNAIRE et al., 2007; MOREAU et al., 2015; MORLEY, 2010). Por exemplo, Pernet e colaboradores (2012) demonstraram que em um mesmo ambiente, ostras cultivadas em cestas flutuantes apresentam uma mortalidade dez vezes maior (80 %) do que quando cultivadas em cordas (8 %). As ostras cultivadas em cestas flutuantes tiveram uma capacidade de depuração do vírus OsHV-1 mais lenta, assim como apresentaram uma maior proliferação de *V. splendidus*, em comparação às ostras cultivadas em cordas (PERNET et al., 2012). Desta forma, a conscientização dos produtores de bivalves a terem boas práticas de manejo é uma das medidas preventivas que podem ser aplicadas não apenas em Santa Catarina, mas em todas as regiões produtoras de bivalves do país. Inclusive, foi desenvolvida uma cartilha com o objetivo de alertar os produtores da possível presença de patógenos associados a mortalidades de ostras no estado, e sugerindo algumas práticas preventivas que poderiam contribuir para a diminuição da probabilidade de ocorrência de mortalidades massivas de ostras em Santa Catarina (Anexo 3).

Como mencionado acima, a presença de contaminantes também pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças em ostras (MORLEY, 2010). Alguns trabalhos já demonstraram que ostras expostas a pesticidas apresentam uma maior susceptibilidade a duas cepas de *V. splendidus* (GAGNAIRE et al., 2007) e ao vírus OsHV-1 (MOREAU et al., 2015). Santa Catarina tem um dos piores índices de saneamento básico do país. Apenas 20 % do esgoto é coletado, o que representa menos da metade da média nacional, que é de 54 % (BRASIL, 2014). Grandes cidades pertencentes ao estado, como Joinville e Blumenau, por exemplo, estão entre as piores cidades do país neste quesito (OLIVEIRA; SCAZUFCA; AROUCA, 2012). De acordo com relatórios de balneabilidade da FATMA, áreas próximas aos cultivos de bivalves apresentam níveis de coliformes termotolerantes acima do permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o qual estabelece que para o cultivo de bivalves destinados à alimentação humana, a média da densidade de coliformes não deve exceder 43 *E. coli*/100 mL, em um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local (CONAMA, 2005). A presença de coliformes termotolerantes, no entanto, não deve ser a única preocupação em meio aos cultivos. Sabe-se que os esgotos sanitários apresentam uma mistura complexa de contaminantes (ABESSA et al., 2005; GAGNÉ; BLAISE, 2003), os quais podem promover efeitos adversos em moluscos bivalves (ISAKSSON, 2010), inclusive para o seu sistema imune (GIRÓN-PÉREZ, 2010). Sendo assim, a contaminação da zona costeira de Santa Catarina é um fato alarmante e que pode ser considerado como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças em ostras cultivadas no estado. O melhoramento do sistema de saneamento básico, aumentando a rede de coleta e tratamento do esgoto sanitário, são medidas preventivas imprescindíveis em um cenário onde organismos patogênicos estão presentes e podem se aproveitar da susceptibilidade dos animais que enfrentam fatores de estresse, como a contaminação aquática.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DO COMPOSTO ELETROFÍLICO CDNB SOBRE A FUNÇÃO DE HEMÓCITOS DE OSTRAS DO PACÍFICO

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Animais

Ostras adultas da espécie *Crassostrea gigas* foram obtidas de uma fazenda de cultivo marinho localizada em Florianópolis, Santa Catarina. Os animais foram aclimatados por um período mínimo de uma semana e mantidos em água do mar filtrada e estéril entre 18 e 20 °C (1 L por animal) e com aeração constante. A renovação de água do mar e alimentação com uma dieta comercial à base de fitoplâncton (Sera® Marin Coraliquid) foram realizadas a cada dois dias.

3.1.2 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa das ostras foi coletada do músculo adutor utilizando-se uma agulha de 0,8 x 30 mm acoplada à uma seringa de 1 mL previamente mantida em gelo. Durante a coleta, cada amostra teve sua qualidade avaliada por microscopia óptica. Amostras contendo sinais de contaminação com qualquer microrganismo, gametas, ou mesmo apresentando hemócitos agregados foram descartadas. A hemolinfa foi agrupada a partir de diversos indivíduos a fim de obter o número de hemócitos necessários para cada ensaio, com um mínimo de 3 animais por amostra. Após a coleta da hemolinfa, a densidade celular de hemócitos foi determinada utilizando-se uma câmara de Neubauer Improved.

3.1.3 Tratamento de hemócitos com CDNB

Para os tratamentos de hemócitos com CDNB (Sigma-Aldrich), a hemolinfa foi centrifugada (600 x g, 10 min, 4°C) e a fração particulada (células) foi ressuspensa em água do mar filtrada (0,2 µm) estéril (AMFE) com ou sem a adição de CDNB (0,1 – 50 µM) e em uma densidade celular de 1×10^6 células/mL. O CDNB foi previamente

diluído em etanol absoluto e a concentração final de etanol foi igualmente ajustada em 0,05 % para cada tratamento, incluindo o grupo controle. Os hemócitos foram então incubados a 20 °C no escuro por 1 h, centrifugados (600 × g, 10 min, 4 °C) e posteriormente utilizados para determinação de sua viabilidade e imunocompetência, além da determinação dos níveis de glutatona total (GSH-t) e PSH, e da atividade das enzimas GR e TrxR.

3.1.4 Ensaios de viabilidade celular

Para avaliar se os tratamentos com CDNB afetaram a viabilidade celular, os ensaios do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e da retenção do vermelho neutro (VN) foram realizados. O ensaio da redução do MTT detecta células viáveis com metabolismo ativo. Células viáveis são capazes de converter o MTT em um produto de formazam com coloração violeta, enquanto que as células mortas perdem esta habilidade. O MTT pode ser reduzido não apenas por desidrogenases mitocondriais, como classicamente caracterizado, mas também por outros compartimentos celulares, sendo um indicativo de atividade metabólica geral (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005). Já o ensaio do VN mede a habilidade do lisossomo em incorporar e reter o corante VN. Este ensaio pode ser afetado quando a permeabilidade da membrana ou a manutenção do baixo pH lisossomal forem comprometidos. O baixo pH lisossomal aprisiona o corante por estar em sua forma iônica (GRUNDY et al., 1996).

Estes ensaios foram ligeiramente modificados de um protocolo anterior de nosso grupo (TREVISAN et al., 2012). Neste estudo, um exato número de células foi utilizado para cada ensaio. Após o tratamento com CDNB, um total de 1×10^6 células (MTT) e 3×10^5 células (VN) foram suspensas em 300 µL de MTT 0,5 mg/ml ou 150 µL de VN 0,004 % (preparados em tampão fosfato-salina ajustado para osmolaridade da água do mar - PBS-NaCl; 513 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), respectivamente. As células foram incubadas por 1 h (MTT) ou 3 h (VN) no escuro a 20 °C, e posteriormente centrifugadas (800 × g, 10 min, 4 °C). As amostras incubadas com MTT foram ressuspensas em 200 µL de dimetilsulfóxido, enquanto que as amostras incubadas com VN foram lavadas 2 vezes com PBS-NaCl e ressuspensas em 200 µL de etanol acidificado (50 % etanol, 1 % ácido acético). A absorbância foi lida a

550 nm (MTT) ou 560 nm (VN) e normalizadas pelo grupo controle. Ambos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.1.5 Níveis de glutatona total e tióis proteicos

Os níveis de glutatona total (GSH-t) e tióis proteicos (PSH) foram quantificados em hemócitos tratados ou não com CDNB (grupo controle). Amostras contendo $1,5 \times 10^6$ células de cada grupo foram tratadas com 50 μL de ácido perclórico (PCA) 0,5 M para precipitação de proteínas, produzindo um extrato ácido. Estas foram, então, homogeneizadas e centrifugadas a $15.000 \times g$ por 2 min. Os sobrenadantes foram coletados e neutralizados com uma solução contendo ácido 3-(N-morfolino)propanesulfônico 0,3 M e KOH 2 M, centrifugados ($15.000 \times g$, 2 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram utilizados para determinar os níveis de GSH-t. A quantificação foi realizada através de um método enzimático amplamente utilizado (AKERBOOM; SIES, 1981).

A análise de PSH foi realizada na fração particulada do extrato ácido, a qual foi lavada com 250 μL de PCA 0,5 M, centrifugada ($15.000 \times g$, 2 min, 4 °C) e ressuspensa em tampão tris-hidroximetilaminometano (TRIS) 0,5 M pH 8,0 contendo dodecil sulfato de sódio 1 % e 0,25 mM de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB). Após incubação sob agitação por 30 min e a temperatura ambiente, as amostras foram lidas em espectrofotometro em 412 nm (JOCELYN, 1987). A leitura de uma alíquota idêntica na ausência de DTNB foi realizada para cada amostra (branco). Ambos ensaios foram realizados em duplicata.

3.1.6 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade GR e TrxR foram determinadas em amostras contendo 1×10^7 células, as quais foram suspensas em 50 μL de ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico 20 mM pH 7,0 contendo 1 % de 3-[(3-colamidopropil)-imetilamonio]-1-propanosulfonato, e homogeneizadas para promover a lise celular. Os lisados celulares foram centrifugados ($20.000 \times g$, 30 min, 4 °C) e os sobrenadantes mantidos a -20 °C até o uso. O ensaio da atividade GR foi realizado em 340 nm seguindo o decréscimo linear da absorbância devido à oxidação do NADPH a NADP^+ na presença do substrato GSSG (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A medida da atividade TrxR foi

realizada através da detecção da redução do DTNB à custa de NADPH, produzindo o produto 2-nitro-5-tiobenzoato, cuja formação foi monitorada em 412 nm (ARNÉR; ZHONG; HOLMGREN, 1999).

3.1.7 Adesão celular

A capacidade de adesão de hemócitos foi analisada após o tratamento com CDNB. Para isto, 5×10^5 células foram suspensas em AMFE, adicionadas a uma placa de fundo chato de 96 poços e deixadas aderir por 45 min a 20 °C no escuro. Após a aderência, o sobrenadante foi removido, e a ele foi adicionado um volume equivalente de AMFE contendo formaldeído 4 % e mantido a 4 °C até o uso. As células presentes no sobrenadante foram então contadas utilizando uma câmara de Neubauer Improved. O ensaio foi realizado em duplicata e a porcentagem de hemócitos com capacidade de adesão foi então calculada a partir da seguinte fórmula:

$$100 - \frac{\text{número de hemócitos que não foram capaz de aderir} \times 100}{\text{número de hemócitos adicionados ao poço}}$$

3.1.8 Fagocitose

A taxa de fagocitose foi determinada utilizando-se de um protocolo adaptado de Hegaret e colaboradores (2003). Após o tratamento com CDNB, 2×10^5 células foram suspensas em AMFE e adicionadas a tubos de citômetro contendo um volume equivalente de plasma filtrado estéril (0,22 µm; obtido das mesmas amostras de hemolinfa) e aproximadamente 4×10^6 microesferas de látex fluorescentes (Fluoresbrite, YG Microspheres, 2 µm, Polysciences). A presença de proteínas plasmáticas promove a opsonização das esferas, o que facilita a fagocitose. As suspensões foram inicialmente mantidas por 30 min no gelo (etapa de ligação dos hemócitos às microesferas) e em seguida incubadas por 1 h a 20 °C no escuro. A porcentagem de hemócitos capazes de internalizar 3 ou mais microesferas foi posteriormente analisada utilizando-se de um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) através do canal de FIT-C. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se do software Flowing Software versão 2.5.1. Este ensaio foi realizado em duplicata.

3.1.9 Produção de espécies reativas de oxigênio

A taxa de produção de ERO foi avaliada utilizando-se de um protocolo adaptado de Hégaret e colaboradores (2003). Após o tratamento com CDNB, 2×10^5 células foram suspensas em AMFE e adicionadas em tubos de citometria contendo um volume equivalente de AMFE com ou sem laminarina (β -1,3-glicanas de *Laminaria digitata*; Calbiochem) como um ativador dos hemócitos, o que leva a produção de ERO. A laminarina foi utilizada na concentração final de 2 mg/mL. O fluróforo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich) foi preparado em AMFE e adicionado às amostras obtendo-se a concentração final de 5 μ M. As amostras foram incubadas por 30 min a 20 °C no escuro. A fluorescência obtida pela oxidação do DCFH foi analisada através da média geométrica da intensidade de sinal obtida pelo canal de FIT-C em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando-se do software Flowing Software versão 2.5.1. Este ensaio foi realizado em duplicata.

3.1.10 Análise estatística

Cada réplica biológica foi obtida a partir de uma mesma amostra de hemolinfa, a qual foi formada por amostras de hemolinfa de um conjunto de animais. As réplicas foram submetidas simultaneamente aos diferentes tratamentos com CDNB. Desta forma, os dados foram analisados utilizando-se a ANOVA de medidas repetidas seguido do teste de *post hoc* de Bonferroni, quando apropriado. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes ($n = 6$).

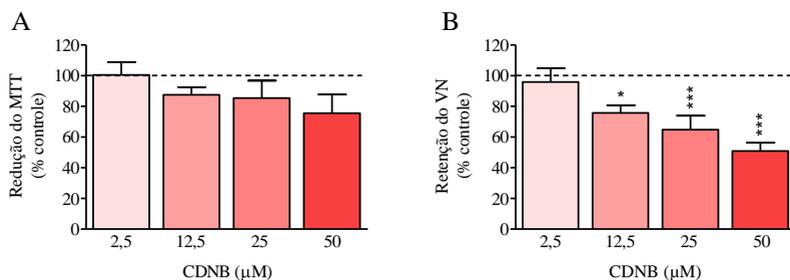
3.2 Resultados

3.2.1 Viabilidade celular

A fim de estimar a citotoxicidade do CDNB (2,5-50 μ M), a viabilidade celular foi analisada por dois diferentes ensaios estabelecidos na literatura, MTT e VN. A redução do MTT por hemócitos não foi significativamente afetada após exposição a nenhuma das concentrações testadas de CDNB (Fig. 17A). Por outro lado, a

retenção do VN foi claramente afetada de maneira concentração dependente. Houve significativa diminuição (25 %) da retenção do vermelho neutro na concentração de 12,5 μM , atingindo 53 % de decréscimo na maior concentração testada (Fig. 17B).

Figura 17. Viabilidade celular de hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.



(A) Redução do MTT e (B) retenção do vermelho neutro (VN). Os dados estão apresentados como porcentagem em relação ao grupo controle (linha tracejada) como média \pm erro padrão médio (n = 6). * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,01$) significam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

3.2.2 Glutathiona total e tióis proteicos

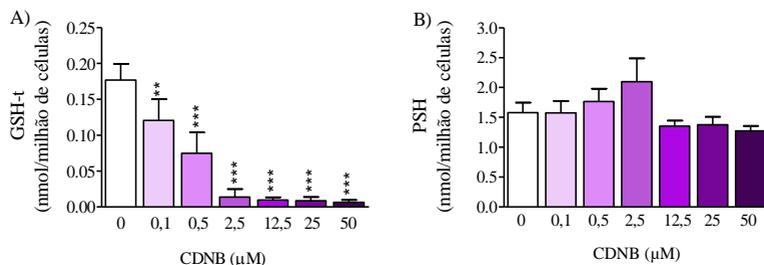
Osníveis de GSH-t apresentaram acentuada diminuição de maneira concentração dependente (Fig. 18A). Um significativo consumo (32 %) de GSH-t foi observado já na concentração mais baixa testada, de 0,1 μM . Mais de 90 % dos níveis de GSH-t foram consumidos com CDNB 2,5 μM , permanecendo baixos para as concentrações maiores. Já os níveis de PSH permaneceram constantes em hemócitos ao longo de todas as concentrações de CDNB testadas (Fig. 18B).

3.2.3 Atividade de tiol redutases

A atividade de duas tiol redutases, GR e TrxR, foram analisadas neste estudo. Ambas as enzimas apresentaram uma menor atividade em resposta ao tratamento com CDNB (Fig. 19). A atividade GR apresentou 47 % de diminuição em hemócitos expostos a CDNB 2,5 μM e 64 % de diminuição na maior concentração testada (50 μM). A TrxR foi menos

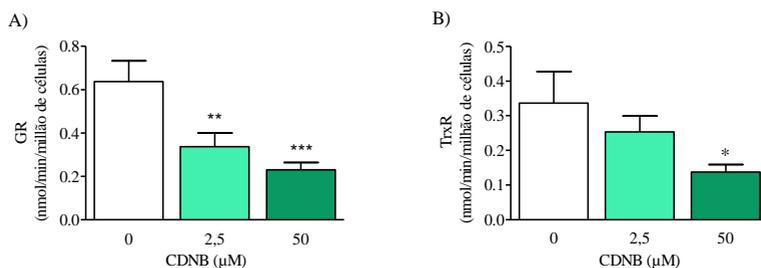
afetada pelo CDNB, apresentando uma diminuição significativa apenas na maior concentração testada (59 %, 50 μM).

Figura 18. Níveis de tióis celulares em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.



Níveis de (A) glutatona total (GSH-t) e (B) tióis proteicos (PSH). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão médio (n = 4). ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001) significam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

Figura 19. Atividade de duas tiolredutases de hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.

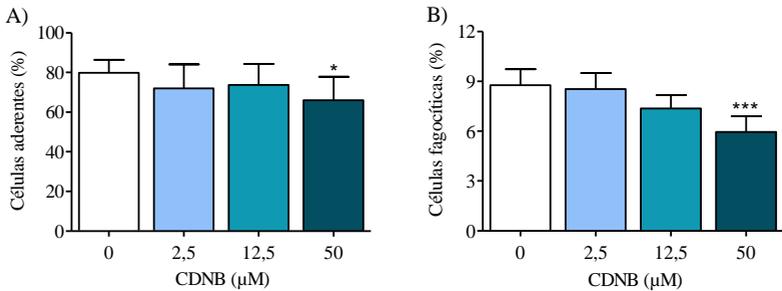


(A) Glutaciona redutase (GR) e (B) tioredoxina redutase (TrxR). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão médio (n = 6). * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001) significam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

3.2.4 Imunocompetência de hemócitos

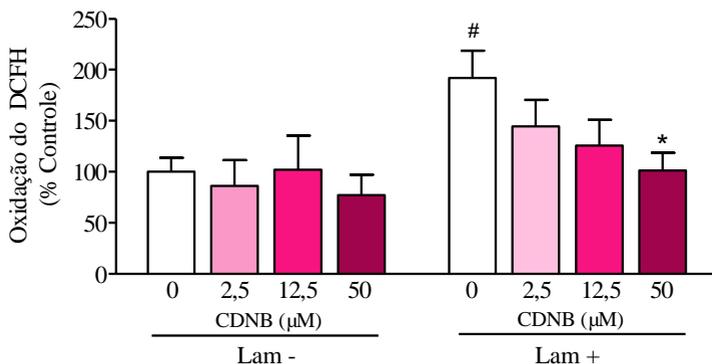
Apesar do tratamento com o CDNB na concentração de 2,5 μM ter diminuído os níveis de GSH-t e atividade da GR, e na concentração de 12,5 μM ter causado, além destes efeitos, uma adicional diminuição da estabilidade da membrana lisossomal (VN), apenas a concentração de 50 μM foi capaz de afetar significativamente as funções celulares dos hemócitos (Figs. 20 e 21). A capacidade de adesão celular foi reduzida em 14 % (Fig. 20A) e a porcentagem de hemócitos capazes de fagocitar partículas “não-próprias” diminuiu aproximadamente 32 % após o tratamento com CDNB 50 μM (Fig. 20B). De maneira similar, esta mesma concentração de CDNB bloqueou completamente o aumento da produção de ERO em células estimuladas com laminarina (Fig. 21).

Figura 20. Capacidade de adesão e de fagocitose de hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.



Porcentagem de (A) hemócitos que foram capazes de aderir a um substrato de poliestireno e (B) de hemócitos capazes de fagocitar microesferas de látex. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão médio ($n = 6$). * ($p < 0,05$), e *** ($p < 0,001$) significam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

Figura 21. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h.



Após a exposição ao CDNB, os hemócitos foram estimulados (Lam +) ou não (Lam -) com laminarina. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão médio ($n = 6$). * ($p < 0,05$) significa diferença estatística em relação ao grupo controle, e # ($p < 0,05$) significa diferença estatística em relação aos respectivos grupos não estimulados com laminarina.

3.3 Discussão

Este foi o primeiro estudo que investigou a importância da glutatona e de tiol redutases na imunocompetência de hemócitos utilizando uma espécie de bivalve como modelo, *C. gigas*. Inicialmente, dois testes de viabilidade celular foram realizados a fim de caracterizar a citotoxicidade do CDNB e definir as melhores concentrações para os experimentos adicionais. De acordo com o ensaio de redução do MTT, o CDNB não compromete a atividade metabólica geral das células em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, o CDNB afetou significativamente a capacidade de retenção do VN em quase todas as concentrações testadas. Este mesmo padrão já havia sido detectado anteriormente em hemócitos tratados *in vivo* com CDNB em ostras *C. gigas*, também causando aumento nos níveis de dano ao DNA e, conseqüentemente, sugerindo que este composto pode afetar a homeostase neste tipo celular (TREVISAN et al., 2012). O CDNB também já foi reportado como um promotor de apoptose em cultura

celular de mamíferos (SEYFRIED; WÜLLNER, 2007), enquanto que em mexilhões *Perna perna* ele não foi capaz de causar efeitos *in vivo* na viabilidade celular de hemócitos (TREVISAN et al., 2014). Os dados sugerem que a citotoxicidade do CDNB pode ser variável, dependente da espécie e modelo celular em estudo, e que hemócitos de *C. gigas* são sensíveis a este composto tanto *in vivo* como *in vitro*, diferentemente do mexilhão *P. perna*.

Neste trabalho o CDNB foi escolhido por ser um composto com características eletrofílicas, sendo capaz de reagir com grupos tiólicos, consumindo GSH e inibindo a enzima TrxR (SEYFRIED; WÜLLNER, 2007). A fim de confirmar se o CDNB foi capaz de comprometer a homeostase tiólica em hemócitos de ostras, os níveis de GSH-t e PSH foram monitorados em conjunto com a atividade das tiol redutases GR e TrxR. Como esperado, o tratamento com CDNB diminuiu drasticamente os níveis de GSH-t a partir da concentração de 2,5 μM . Este dado corrobora dados de outros estudos os quais utilizaram este composto em culturas de células de mamíferos, o que leva à depleção dos níveis de GSH celular (CHIA et al., 2010; KRANCE et al., ; PADGAONKAR et al., 2014). Em bivalves, a depleção de GSH já foi observada *in vivo* nas brânquias de ostras *C. gigas* e de mexilhões *P. perna* tratados com CDNB (TREVISAN et al., 2012, 2014, 2016). Acredita-se que o consumo de GSH ocorra devido a ação da GST, a qual conjugua compostos eletrofílicos com GSH e cujos metabólitos são tipicamente excretados pela via do ácido mercaptúrico (MEISTER; ANDERSON, 1983), como já demonstrado para ostras *C. gigas* (TREVISAN et al., 2016). Esta via parece ser um mecanismo crucial de sobrevivência, uma vez que o aumento na atividade da GST se comprovou como citoprotetor contra a toxicidade do CDNB (KITANI et al., 1994; WAREING et al., 1993). Se a depleção de GSH-t observada neste estudo for relacionada à conjugação de CDNB com GSH, então os hemócitos de ostras podem ter um efetivo sistema de detoxificação capaz de conferir significativa proteção celular, assunto não estudado em detalhes até então.

Dentre as diferentes concentrações de CDNB testadas até então, a atividade das enzimas GR e TrxR foram investigadas utilizando duas concentrações de CDNB que promoveram diferentes efeitos nos hemócitos de *C. gigas*. A primeira causou a depleção de GSH mas não afetou a viabilidade celular (2,5 μM), enquanto que a outra não apenas causou a depleção de GSH como também induziu distúrbios lisossomais (50 μM). Como mencionado anteriormente, o CDNB é um clássico inibidor da TrxR em mamíferos através da alquilação de seu sítio ativo

(ARNÉR; BJÖRNSTEDT; HOLMGREN, 1995). No presente estudo, o CDNB (50 μM) foi capaz de inibir a atividade da TrxR em hemócitos de ostras. Da mesma forma, esse padrão de inibição foi detectado em brânquias de ostras e mexilhões (TREVISAN et al., 2012, 2014). Com relação à GR, já foi observado que esta enzima pode ser inibida por CDNB e seu metabólito CDNB-GSH, sendo o segundo capaz de sobrepor o sítio de ligação da GSSG na GR (BILZER et al., 1984). No presente trabalho, a GR apresentou maior sensibilidade ao CDNB que a TrxR. A atividade da GR em hemócitos foi significativamente reduzida na menor concentração de CDNB testada (2,5 μM), apresentando um efeito mais forte na concentração de 50 μM . Este cenário parece ser um fenômeno consistente em bivalves, uma vez que a inibição da GR por CDNB também foi detectada *in vivo* em ostras e mexilhões (TREVISAN et al., 2012, 2014). Já é conhecido que a inibição dessas duas enzimas em bivalves pode levar a distúrbios na capacidade de detoxificar peróxidos através de mecanismos que dependam de GSH e Trx reduzidas, como os sistemas da GPx e Prx (TREVISAN et al., 2012, 2014). Entretanto, deve ser mencionado que, tendo em vista a depleção de GSH por CDNB em ambas concentrações testadas para as atividades da GR e TrxR, é possível que a inibição da GR *per se* tenha um impacto fisiológico de menor expressão, uma vez que seu substrato foi drasticamente diminuído, e, portanto, estaria pouco disponível para a célula.

Neste estudo os níveis de PSH não foram afetados por CDNB. Contudo, foi observado em um estudo anterior que o CDNB foi capaz de causar diminuição *in vivo* dos níveis de PSH na brânquia de ostras (TREVISAN et al., 2012), um efeito que não foi observado em mexilhões (TREVISAN et al., 2014). Não é claro como os PSH celulares estão protegidos da reação com CDNB em hemócitos; entretanto, a menor atividade da GR e TrxR indicam que o CDNB pode reagir rapidamente com algumas proteínas específicas contendo grupos tiólicos livres.

Não há dúvidas que o CDNB foi capaz de afetar drasticamente os níveis de tióis celulares em hemócitos de *C. gigas*. Dessa forma, em uma etapa posterior, foi investigado se esta alteração poderia afetar diretamente a competência imunológica dos hemócitos. Surpreendentemente, em um cenário onde praticamente não há GSH intracelular disponível e menos de 50% de atividade da GR (CDNB 2,5 μM), as células ainda foram capazes de aderir e fagocitar, assim como aumentar a produção de ROS após estimulação por laminarina. Entretanto, em um cenário mais crítico onde não apenas a GSH foi

depletada e a GR inibida, mas também a TrxR foi inibida, todas as funções celulares analisadas foram afetadas pelo tratamento com CDNB 50 μM . Ou seja, simples depleção de GSH (CDNB 2,5 μM), não afeta a função dos hemócitos, mas quando outros alvos são afetados (CDNB 50 μM), as funções dos hemócitos ficam comprometidas.

Estes dados levantam a questão se o sistema da Prx/Trx/TrxR poderia ser mais importante para a função dos hemócitos que o sistema da GPx/GSH/GR. A fim de melhor investigar esta possibilidade, estudos com inibição específica da GR ou da TrxR seriam extremamente úteis. Por exemplo, já foi realizada a inibição seletiva da GR ou da TrxR através de carmustina ou auranofina, respectivamente, em três linhagens de células neurais (MITOZO et al., 2011). Neste estudo foi concluído que, nas células utilizadas, o sistema da Prx/Trx/TrxR parece não ser tão importante quanto o sistema da GPx/GSH/GR, o oposto do que sugere o presente estudo com hemócitos de ostras. Esta discussão destaca a necessidade de estudos adicionais e mais específicos com relação ao metabolismo de tióis em bivalves, a fim de substituir extrapolações de processos celulares de mamíferos.

O exato mecanismo envolvido nas alterações na imunocompetência dos hemócitos observadas na exposição a CDNB 50 μM deve ser melhor investigado. Ainda assim, uma hipótese pode ser baseada nos efeitos indiretos devido à depleção de tióis e distúrbio no sistema redox, causando alterações no ambiente redutor intracelular, assim como na sinalização e função celular. A capacidade de adesão e de fagocitose de células imunes, por exemplo, pode ser particularmente sensível ao estresse oxidativo (HOUSE; LUEBKE; KIMBER, 2006). Neste contexto, uma menor atividade fagocítica de hemócitos foi reportado em bivalves expostos a agentes potencialmente indutores da formação de ERO, como metais, fenóis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nanopartículas (CHENG; SULLIVAN, 1984; CIACCI et al., 2012; FRIES; TRIPP, 1980; PICHAUD et al., 2008). Outra hipótese é baseada no fato de que o CDNB pode atingir proteínas diretamente envolvidas na defesa imunológica. Por exemplo, sabe-se que o CDNB é capaz de inibir a produção de óxido nítrico induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos de camundongos, ao impedir que o fator de transcrição NF- κ B se ligue ao DNA (HEISS; GERHÄUSER, 2005). NF- κ B (também chamado de proteínas Rel) representam uma família de fatores de transcrição envolvidos no controle de um amplo número de processos biológicos, incluindo respostas imunológicas e inflamatórias. O primeiro gene homólogo de NF- κ B identificado em bivalves foi em *C. gigas* (*Cg-Rel*), o qual foi identificado posteriormente

em outras espécies. Estas caracterizações moleculares sugerem que a via de sinalização do NF- κ B esteja provavelmente presente neste grupo (SONG et al., 2010). No presente trabalho, a oxidação da DCFH em hemócitos após indução com laminarina foi bloqueada pela exposição a CDNB 50 μ M. O DCFH reage com diversas ERO e outros agentes oxidantes, incluindo o óxido nítrico (IMRICH; KOBZIK, 1997). Dessa forma, seria razoável pensar que a menor oxidação do DCFH detectada no presente estudo possa estar relacionada a uma inibição da produção desta molécula oxidante, através de uma interferência do CDNB na via do NF- κ B. Além disso, é conhecido que as enzimas com atividade NADPH oxidase, responsáveis pela indução da produção de ERO em fagolisossomos e membranas celulares, possam ser inativadas por agentes alquilantes de tióis devido à presença deste grupo funcional em sua estrutura (CROSS, 1990). Dessa forma, o CDNB teria o potencial de reagir com esses tióis de maneira semelhante ao mecanismo de ação sugerido para a inibição da TrxR (SEYFRIED; WÜLLNER, 2007), inibindo a produção de ERO dependente desta enzima e consequentemente levando ao bloqueio da indução da produção de ERO detectado neste estudo.

De maneira geral, este trabalho apresenta uma observação notável de que mesmo quando a GSH se encontra praticamente depletada, em associação com uma menor eficiência de uma importante tiol redutase (GR), alguns parâmetros relacionados à imunocompetência dos hemócitos permanecem inalterados. De maneira interessante, estes mesmo parâmetros foram afetados somente quando uma segunda tiol redutase (TrxR) foi inibida. Os resultados obtidos através deste trabalho abrem novos caminhos para futuros estudos a respeito da interação entre os sistemas de defesa imunológica e antioxidante de bivalves, os quais podem investigar as seguintes perguntas: (i) os efeitos observados na imunocompetência foram uma consequência de distúrbios nos tióis celulares ou um resultado de interações diretas do CDNB com moléculas relacionadas ao sistema imune; (ii) a disponibilidade de GSH seria de fato dispensável para a função e homeostase celular de hemócitos; (iii) o sistema da Prx/Trx/TrxR seria mais importante para a imunocompetência de hemócitos que o sistema da GPx/GSH/GR; (iv) outros compostos eletrofílicos, entre eles poluentes ambientais, poderiam promover efeitos similares de imunossupressão e tornar bivalves mais susceptíveis a patógenos em seus ambientes naturais? As respostas para estas questões poderiam contribuir com o conhecimento básico sobre sistemas de defesa em bivalves marinhos, auxiliando inclusive na interpretação de estudos de monitoramento ambiental que

frequentemente utilizam esses organismos como sentinelas. Poder-se-ia visar ainda uma futura contribuição para a saúde de moluscos cultiváveis.

CAPÍTULO 4 – IMPORTÂNCIA DA GLUTATIONA PARA A FUNÇÃO DOS HEMÓCITOS E PARA A SOBREVIVÊNCIA DE OSTRAS DO PACÍFICO MEDIANTE DESAFIOXIDATIVOS OU BACTERIANOS

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Animais e coleta de hemolinfa

Ostras *Crassostrea gigas* adultas de ambos os sexos, com largura da concha de 4.7 ± 0.6 cm, comprimento da concha de 8.5 ± 0.4 cm, e peso mole total de 13.5 ± 7.5 g, foram adquiridas de uma fazenda de cultivo marinho localizada em Florianópolis, Santa Catarina. Os animais foram aclimatados em condições de laboratório por pelo menos uma semana antes dos experimentos, conforme apresentado na seção 3.1.1.

A coleta de hemolinfa foi realizada de acordo com o protocolo disponível na seção 3.1.2, com a diferença de que neste estudo cada amostra foi obtida de um único animal.

4.1.2 Bactérias

Diferentes espécies do gênero *Vibrio* foram utilizadas neste estudo: *V. alginolyticus* (ATCC 17749), *V. anguillarum* (ATCC 19264), *V. harveyi* (ATCC 14126), *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *V. vulnificus* (LAM 64 Canada). A cepa de *V. alginolyticus* foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina), enquanto que as demais cepas foram gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Maria Risoleta Freire Marques (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina). Todas as espécies foram cultivadas em meio LB Broth (Sigma-Aldrich) contendo NaCl 3 % e incubadas a 20-22 °C por aproximadamente 16 h. As bactérias foram recuperadas por centrifugação ($1.000 \times g$, 10 min, 20 °C), suspensas em AMFE e utilizadas para investigar a atividade fagocítica de hemócitos e para os ensaios de desafio bacteriano.

4.1.3 *Tratamentos com BSO*

A fim de promover a depleção de GSH, ostras foram tratadas com uma solução de 60 mM de DL-BSO (Sigma-Aldrich), diluído em AMFE. O tratamento foi realizado utilizando-se de uma agulha 23 G acoplada a uma seringa de 1 mL a fim de injetar 250 μ L da solução de BSO diretamente no músculo adutor (equivalente a 15 μ mol/animal por injeção) através de um furo na concha. Este furo foi feito pelo menos 48 h antes a fim de evitar este fator de estresse no dia do tratamento.

Para a análise de GSH-t, amostras de brânquia, glândula digestiva e hemolinfa foram coletadas após 1, 2, 3 ou 6 dias de exposição. Organismos expostos a BSO por 2 e 3 dias receberam 2 ou 3 injeções de BSO (uma a cada 24 h), respectivamente, enquanto que animais expostos a BSO por 6 dias receberam 3 injeções (uma a cada 48 h). Assim, os animais foram tratados com um total de 15 (1 dia), 30 (2 dias) ou 45 (3 e 6 dias) μ mol de BSO por animal. Cada tratamento também possuiu seu próprio grupo controle, o qual recebeu o mesmo protocolo de injeções, porém contendo apenas AMFE (250 μ L/animal a cada injeção). As demais análises (parâmetros associados aos hemócitos e ensaios de sobrevivência) foram realizadas apenas em ostras expostas ao BSO por 3 dias.

4.1.4 *Análise de GSH-t*

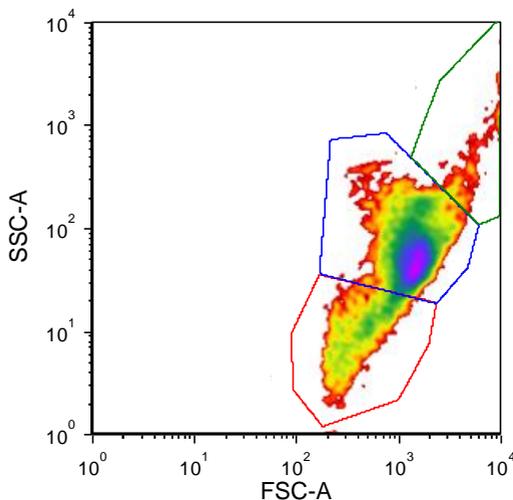
Aproximadamente 50 mg de tecido de brânquias ou glândula digestiva (peso úmido) e 1×10^6 hemócitos foram utilizados para a quantificação dos níveis de GSH-t. As análises feitas com hemócitos foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos na seção 3.2.5. Os tecidos (brânquia e a glândula digestiva) foram homogeneizados em 500 μ L de uma solução de PCA 0,5 M, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético 0,3 mM, através de um homogeneizador de tecidos (Omni TH; Omni International). Os homogenatos foram centrifugados ($15.000 \times g$, 2 min, 4 °C) e os sobrenadantes utilizados para a determinação de GSH-t através de ensaio espectrofotométrico em 412 nm, através de um método enzimático (TIETZE, 1969).

4.1.5 Parâmetros associados aos hemócitos

A THC foi determinada utilizando-se o contador automático de células TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad). A DHC foi realizada por citometria de fluxo, analisando-se o tamanho (*Forward Scatter* ou FSC) e complexidade (*Side Scatter* ou SSC) dos hemócitos através do FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo software FCS Express 5 Plus (De Novo Software). A população de hemócitos foi sub-dividida em hemócitos hialinos, hemócitos granulares e agregados (Fig.22).

A determinação da viabilidade celular, da capacidade de adesão e da atividade fagocítica de hemócitos contra microesferas de látex foram realizadas de acordo com os protocolos descritos nas seções 3.1.4, 3.1.7 e 3.1.8, respectivamente.

Figura 22. Figura representativa mostrando o perfil das populações de hemócitos obtido por citometria de fluxo.



A contagem diferencial de hemócitos de ostras *C. gigas* foi feita através da separação dos dados em três diferentes grupos, o que permitiu distinguir hemócitos hialinos, granulares e agregados.

A porcentagem de hemócitos capazes de fagocitar vibrios inativados também foi determinada. Foram utilizadas as cepas de

Vibrio descritas na seção 4.1.2, seguindo o protocolo de crescimento e coleta das mesmas, também descrito nesta mesma seção. A marcação das bactérias com o iodeto de propídeo (IP) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Hasui e colaboradores (1989), com algumas modificações. Para tal, as bactérias foram inativadas através de incubação a 70 °C por 20 min, posteriormente lavadas duas vezes com AMFE e suspensas em solução salina estéril 0,9 % contendo 50 µg/mL de IP. Após 1 h de incubação a 20 °C no escuro, as bactérias marcadas com IP (*Vibrio*-IP) foram lavadas duas vezes com AMFE e suspensas em AMFE na densidade celular de aproximadamente 10⁶ bactérias/µL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em gelo até o uso. Hemolinfa contendo 2 x 10⁵ hemócitos foi adicionada em cada um dos tubos de citometria a ser analisado. Em seguida, foi adicionado 40 µL (4 x 10⁷ células) de cada suspensão de *Vibrio*-IP (200 bactérias:1 hemócito). Os tubos foram então mantidos no gelo por 30 min a fim de sincronizar os processos de reconhecimento e ligação às bactérias, e a fagocitose foi realizada incubando-se as amostras por 1 h a 20 °C no escuro. Um conjunto adicional de tubos, contendo a hemolinfa (hemócitos) e as diferentes cepas de *Vibrio*-IP foi incubado por 1 h somente no gelo e usado como controle negativo. A porcentagem de hemócitos capazes de internalizar bactérias inativas foi determinada através de citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences) utilizando o canal PerCP. Os dados foram analisados pelo software Flowing Software 2.5.1 e os valores obtidos dos controles negativos foram descontados a fim de excluir possíveis bactérias ligadas à superfície celular mas não internalizadas.

4.1.6 Ensaios de sobrevivência

4.1.6.1 Desafios oxidativos

Ostras foram expostas (via água do mar, 1 L/animal) a hidroperóxido de cumeno (CHP; Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,3, 1 ou 3 mM. Já o H₂O₂ (Vetec Química) foi testado nas concentrações de 10, 30 e 100 mM. Tendo em vista a baixa solubilidade do CHP em água do mar, a solução de CHP 3 mM foi agitada por 1 h e então utilizada para obtenção das demais concentrações utilizadas neste estudo. A mortalidade foi investigada por 96 h e a troca de água do mar

foi realizada a cada 24 h, seguida de reposição das concentrações iniciais de CHP ou H₂O₂.

Um conjunto adicional de experimentos foi realizado com ostras previamente tratadas com BSO ou AMFE por 3 dias (conforme descrito na seção 4.1.3). Em seguida, estas ostras foram expostas a CHP 1 e 3 mM ou H₂O₂ 10 e 30 mM. A mortalidade foi analisada por 96 h e a troca de água do mar foi realizada a cada 24 h, seguida de reposição das concentrações iniciais de CHP ou H₂O₂. Durante os experimentos, os animais não foram alimentados.

4.1.6.2 *Desafios bacterianos*

As 5 espécies de *Vibrio* foram preparadas de acordo com a seção 4.1.2 e suspensas em AMFE. Ostras foram injetadas com 500 µL da suspensão de bactérias utilizando-se de uma agulha 23G acoplada à uma seringa de 1 mL, através de um furo feito na concha, diretamente no músculo adutor. Para este ensaio foram utilizadas três diferentes cargas bacterianas: $1,7 \times 10^8$ (baixa), $5,1 \times 10^8$ (média) e $1,5 \times 10^9$ (alta) bactérias/500 µL. A mortalidade foi acompanhada por 96 h.

Posteriormente, um conjunto adicional de experimentos foi realizado onde ostras previamente tratadas com BSO ou AMFE (conforme descrito na seção 4.1.3) foram posteriormente injetadas com carga bacteriana mais alta ($1,5 \times 10^9$ bactérias/500 µL) de cada suspensão de *Vibrio* e a mortalidade foi monitorada por 96 h.

Durante todos os desafios bacterianos as ostras foram mantidas em água do mar filtrada e estéril (1 L/animal) a 19-21 °C sob constante aeração. Metade do volume de água foi trocado a cada 24 h e os animais não foram alimentados durante os experimentos.

4.1.7 *Análises estatísticas*

Os dados foram analisados para distribuição normal de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Em seguida, os dados foram analisados por teste “t” de Student (dados paramétricos) ou, quando foram encontradas diferenças entre as variâncias, pelo teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes (n=10-12).

4.2 Resultados

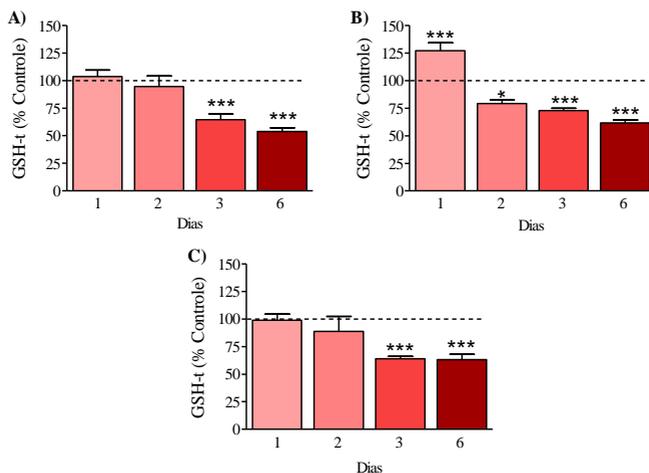
4.2.1 Níveis de GSH-t

A primeira etapa deste trabalho foi a de padronizar um tratamento que levasse a um decréscimo generalizado nos níveis de GSH em ostras. Para isto, um inibidor da síntese de GSH (BSO) foi utilizado em vários regimes de tratamento. Os níveis de GSH-t, foram, então, medidos na brânquia, glândula digestiva e hemócitos de ostras do Pacífico. Não foi possível detectar GSH na fração plasmática da hemolinfa (dados não apresentados). O tratamento com BSO levou à depleção de GSH na brânquia, glândula digestiva e hemócitos (Fig. 23). Nas brânquias, os níveis de GSH-t diminuíram 35,4 e 46,2 % após 3 e 6 dias de exposição, respectivamente (Fig. 23A). Na glândula digestiva, o conteúdo de GSH-t teve um padrão levemente diferente, uma vez que aumentou 27,3 % após 1 dia de exposição, seguido de sua diminuição após 2, 3 e 6 dias de exposição (20,7 %, 27,1 % e 38,2 %, respectivamente (Fig. 23B). Os hemócitos apresentaram uma resposta similar à das brânquias, apresentando menores níveis de GSH-t (36 %) após 3 e 6 dias de exposição (Fig. 23C).

4.2.2 Influência da depleção de GSH para a função dos hemócitos

Os efeitos dos distúrbios causados pela depleção parcial de GSH (depleção de ~30 %) foram investigados em hemócitos de ostras tratadas com BSO por 3 dias. Não foram observadas diferenças em nenhum dos parâmetros associados aos hemócitos após o tratamento dos animais com o BSO. Os parâmetros analisados foram: hemograma das ostras (THC e DHC) (Tabela 5); viabilidade, capacidade de adesão e fagocítica (microesferas de látex)(Tabela 6); e capacidade fagocítica de *Vibrio*-IP inativados (Tabela 7).

Figura 23. Níveis de glutatona total (GSH-t) nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* tratadas com o agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).



Animais foram expostos através de injeção no músculo adutor (15 $\mu\text{mol}/\text{animal}$ por injeção), sendo que ostras expostas por 2 e 3 dias receberam uma injeção de BSO a cada 24 h, enquanto que ostras expostas por 6 dias receberam uma injeção de BSO a cada 48 h. (A) Brânquias, (B) glândula digestiva, e (C) hemócitos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão médio ($n = 10-12$). * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

Tabela 5. Hemograma de ostras *Crassostrea gigas* expostas ao agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).

	THC (10^6 células/mL)	DHC (% de cada grupo de hemócitos)		
		Hialinos	Granulares	Agregados
Controle	2.6 ± 1.1	18.2 ± 5.5	80.0 ± 5.4	2.0 ± 1.3
BSO	2.9 ± 1.5	20.7 ± 6.3	77.3 ± 6.2	2.2 ± 0.9

Animais foram tratados com BSO (45 $\mu\text{mol}/\text{animal}$) por 3 dias, e a hemolinfa foi utilizada para a contagem total (THC) e diferencial (DHC) de hemócitos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 12$).

Tabela 6. Viabilidade e imunocompetência de hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostas ao agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).

	VN (% Controle)	MTT (% Controle)	Fagocitose (% células fagocíticas)	Adesão (% células aderentes)
Controle	100.0 ± 21.0	100.0 ± 19.1	32.0 ± 8.4	94.5 ± 3.5
BSO	92.6 ± 19.4	94.9 ± 27.5	33.5 ± 12.7	93.7 ± 5.1

Animais foram tratados com BSO (45 µmol/animal) por 3 dias, e os hemócitos foram utilizados para a quantificação da retenção do vermelho neutro (VN) e redução do MTT. A imunocompetência foi avaliada através da capacidade dos hemócitos de fagocitar microesferas de látex ou se aderirem a um substrato de poliestireno. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 12).

Tabela 7. Fagocitose de víbrios inativados marcados com iodeto de propídeo (*Vibrio*-IP) por hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostas ao agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).

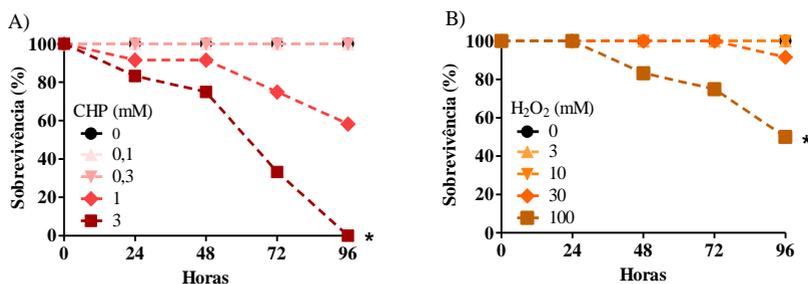
<i>Vibrio</i> -IP	Controle	BSO
<i>V. alginolyticus</i>	4.4 ± 2.6	3.9 ± 3.8
<i>V. anguillarum</i>	6.1 ± 3.3	5.3 ± 5.2
<i>V. harveyi</i>	5.1 ± 4.6	2.7 ± 2.9
<i>V. parahaemolyticus</i>	4.5 ± 3.8	2.6 ± 2.9
<i>V. vulnificus</i>	8.5 ± 5.4	6.6 ± 6.5

Animais foram tratados com o BSO (45 µmol/animal) por 3 dias, e os hemócitos foram utilizados para a avaliar a porcentagem de hemócitos capazes de fagocitar bactérias correspondentes a 5 diferentes espécies de *Vibrio*. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 12).

4.2.3 Importância da GSH para a sobrevivência de ostras desafiadas com peróxidos

Inicialmente curvas de sobrevivência foram construídas para se estabelecer as concentrações de peróxidos a serem utilizados nos experimentos subsequentes. Os resultados mostram claramente que as ostras são muito mais sensíveis à exposição ao CHP (Fig. 24A) do que ao H₂O₂ (Fig. 24B). A mortalidade foi diretamente proporcional às concentrações dos peróxidos estudados, sendo que mortalidades estatisticamente significativas foram obtidas com 3 mM de CHP (100 % de mortalidade) (Fig. 24A), e 100 mM de H₂O₂ (50 % de mortalidade) (Fig. 24B).

Figura 24. Taxa de sobrevivência de ostras *Crassostrea gigas* expostas a diferentes concentrações de agentes pró-oxidantes.



Animais foram expostos a (A) hidroperóxido de cumeno (CHP) 0,1-3 mM ou a (B) peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3-100 mM por 96 h. * ($p < 0,05$) indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (n = 10-12).

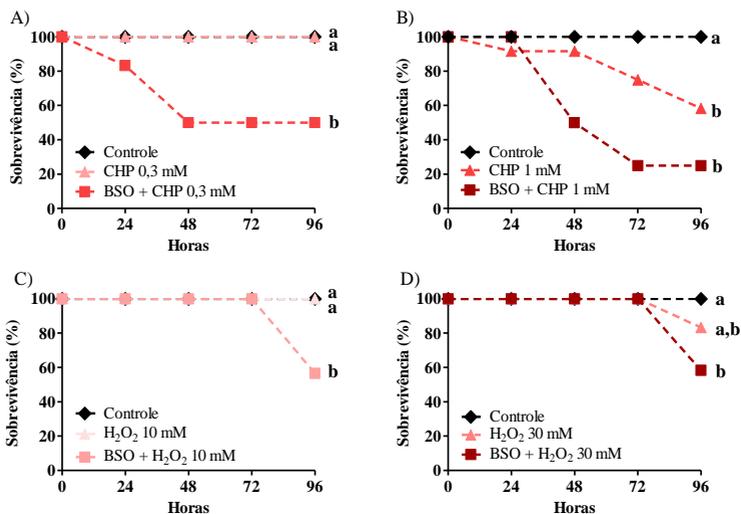
Ostras apresentando cerca de 30 % menos GSH após o tratamento com BSO foram expostas a diferentes concentrações destes dois agentes pró-oxidantes. Este tratamento teve o objetivo de caracterizar a importância da GSH para a sobrevivência de *C. gigas* expostas agudamente a elevadas concentrações de peróxidos. O pré-tratamento com BSO aumentou significativamente em 50 % a taxa de mortalidade de ostras no grupo CHP 0,3 mM (Fig. 25A) e apresentou uma forte tendência de aumento (33 %) no grupo CHP 1 mM (Fig. 25B). O pré-tratamento com BSO também aumentou significativamente a toxicidade H₂O₂, levando a um aumento de 43 % na taxa de mortalidade no grupo tratado com H₂O₂ 10 mM (Fig. 25C), apresentando também uma tendência de aumento (25 %) da mortalidade no grupo H₂O₂ 30 mM (Fig. 25D).

4.2.4 Importância da GSH para a sobrevivência de ostras desafiadas com bactérias do gênero *Vibrio*

Foram analisadas as taxas de sobrevivências de ostras expostas a cinco diferentes espécies de *Vibrio* a fim de caracterizar a virulência das mesmas para *C. gigas* (Fig. 26). De maneira geral, as taxas de mortalidade das ostras expostas às várias espécies de víbrio foram relativamente baixas. Apenas as espécies *V. anguillarum* (Fig. 26A) e *V. parahaemolyticus* (Fig. 26B) causaram mortalidades significativas (42 %), as quais foram observadas apenas quando a maior carga bacteriana

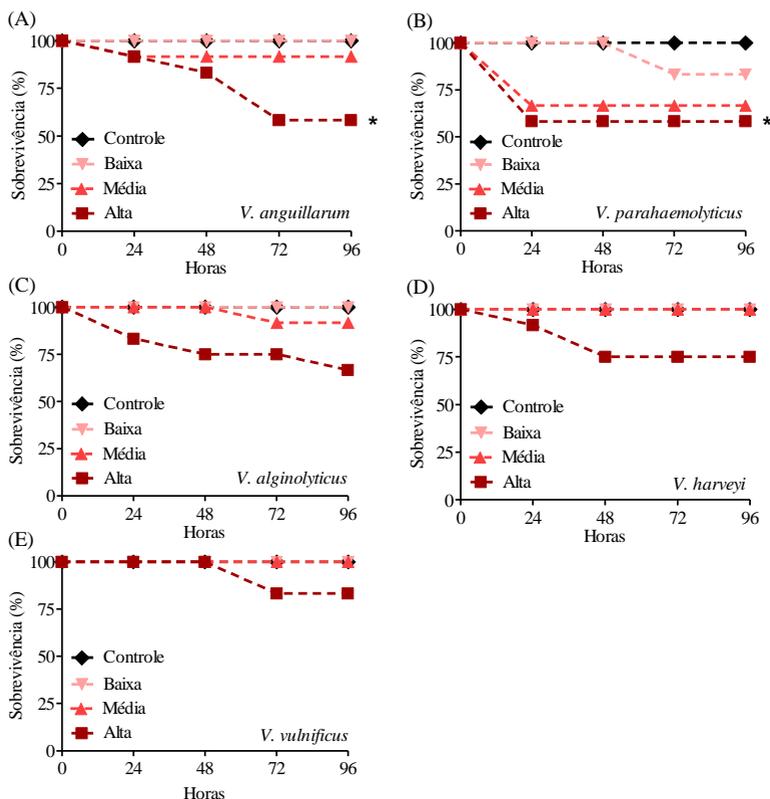
foi injetada ($1,5 \times 10^9$ células). As maiores taxas de mortalidade registradas para as outras espécies de víbrio foram de 17, 25 e 33 % para as espécies *V. vulnificus* (Fig. 26C), *V. harveyi* (Fig. 26D) e *V. alginolyticus* (Fig. 26E), respectivamente. Estes valores foram obtidos com a maior carga bacteriana, porém não diferiram estatisticamente do controle (ostras injetadas apenas com AMFE).

Figura 25. Taxa de sobrevivência de ostras *Crassostrea gigas* expostas a agentes pró-oxidantes após pré-tratamento com o agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).



Animais foram pré-tratados com o BSO (45 μ mol/animal; exposiao de 3 dias) ou veículo (gua do mar filtrada estéril; AMFE) e subsequentemente expostos a CHP (A) 0,3 ou (B) 1 mM e H₂O₂ (C) 10 ou (D) 30 mM por 96 h. Letras diferentes significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos (n = 10-12).

Figura 26. Taxa de sobrevivência de ostras *Crassostrea gigas* desafiadas com *Vibrio* spp.

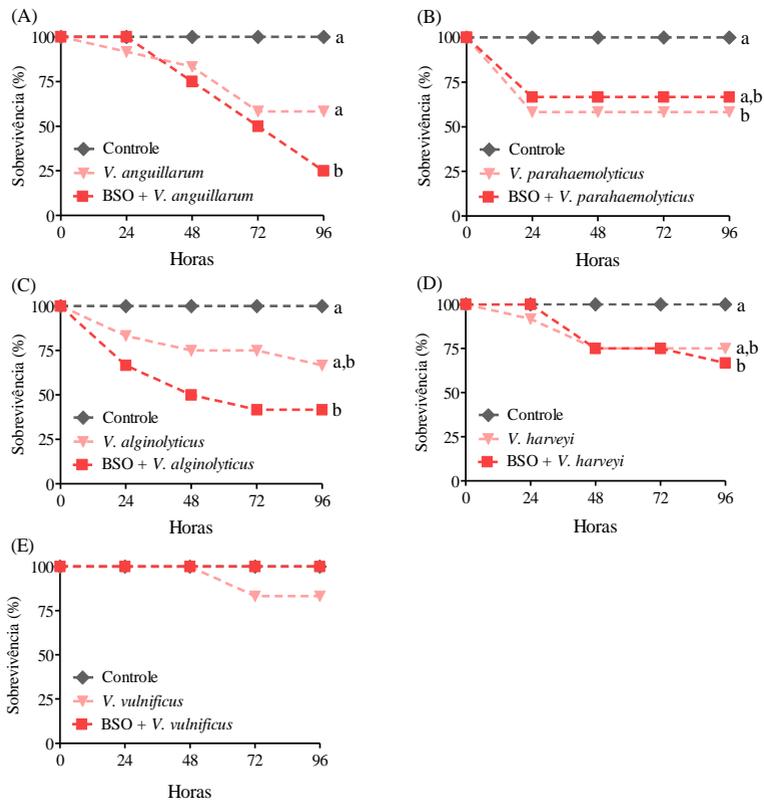


Animais foram injetados uma única vez com três diferentes cargas de bactérias pertencentes a 5 diferentes espécies: (A) *V. anguillarum*, (B) *V. parahaemolyticus*, (C) *V. alginolyticus*, (D) *V. harveyi* e (E) *V. vulnificus*. As ostras foram injetadas com três diferentes cargas bacterianas: $1,7 \times 10^8$ (baixa), $5,1 \times 10^8$ (média) ou $1,5 \times 10^9$ (alta) bactérias. * ($p < 0,05$) significam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle ($n = 10-12$). O grupo controle recebeu uma única injeção com água do mar filtrada estéril.

Após avaliar o efeito da depleção de GSH por BSO na imunocompetência de hemócitos e caracterizar a virulência das diferentes espécies de *Vibrio* para ostras *C. gigas*, foi investigado se a depleção de GSH poderia aumentar a susceptibilidade das ostras

adiversas espécies de víbrios (Fig. 27). O pré-tratamento com BSO aumentou significativamente (33 %) a taxa de mortalidade de ostras desafiadas com *V. anguillarum* (Fig. 27A), e aumentou de forma marginalmente significativa a taxa de mortalidade de ostras desafiadas com as bactérias *V. alginolyticus* (Fig. 27C) e *V. harveyi* (Fig. 27D). O pré-tratamento com BSO não aumentou a taxa de mortalidade das ostras desafiadas com as espécies *V. parahaemolyticus* (Fig. 27B) e *V. vulnificus* (Fig. 27E).

Figura 27. Taxa de sobrevivência de ostras *Crassostrea gigas* desafiadas com víbrios após pré-tratamento com o agente depletor de glutatona butionina sulfoximina (BSO).



Animais foram pré-tratados com o BSO (45 $\mu\text{mol}/\text{animal}$; exposição de 3 dias) ou veículo (água do mar filtrada estéril; AMFE) e subsequentemente injetados

uma única vez com uma alta carga de bactérias ($1,5 \times 10^9$) pertencentes a 5 diferentes espécies: (A) *V.anguillarum*, (B) *V. parahaemolyticus*, (C) *V. alginolyticus*, (D) *V. harveyi* e (E) *V. vulnificus*. Letras diferentes significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos ($n = 10-12$). O grupo controle recebeu o mesmo protocolo de injeções que os animais dos outros tratamentos, porém com AMFE.

4.3 Discussão

No presente estudo o BSO foi utilizado como inibidor da síntese de GSH (MEISTER; ANDERSON, 1983) a fim de diminuir os níveis deste antioxidante. Com isto, foi possível investigar a importância da GSH na defesa imunológica e sobrevivência de ostras *C. gigas* sob desafios oxidativos e bacterianos. Este foi o primeiro estudo a investigar a importância da GSH para a imunidade de bivalves utilizando um agente que atua de forma específica na depleção de GSH.

O BSO já foi utilizado com sucesso em bivalves para diminuir os níveis de GSH nas gônadas e na glândula digestiva (incluindo estudos *in vitro* com células isoladas da glândula digestiva), entretanto estes estudos tiveram o objetivo de investigar o papel da GSH em outros processos fisiológicos, tais como a reprodução, proteção contra metais e respostas contra fatores de crescimento (CANESI et al., 2000; CONNERS; RINGWOOD, 2000; RINGWOOD; CONNERS, 2000). A depleção de GSH nas gônadas não afetou diretamente na taxa de fertilização, porém aumentou a susceptibilidade dos gametas a metais (RINGWOOD; CONNERS, 2000). Com relação à glândula digestiva, apesar do BSO diminuir significativamente os níveis de GSH (45-65 %), não foram detectadas alterações celulares e bioquímicas (*i.e.* níveis de metalotioneínas e de peroxidação lipídica, e estabilidade da membrana lisossomal), sugerindo que menores níveis de GSH não promovem efeitos notáveis em glândulas digestivas de ostras *C. virginica* (CONNERS; RINGWOOD, 2000). Novamente, a depleção de GSH aumentou a toxicidade de metais, induzindo a desestabilização da membrana lisossomal e a peroxidação lipídica, assim como, levando a uma perda da resposta adaptativa de síntese de metalotioneínas (CONNERS; RINGWOOD, 2000). Baseado em estudos com células isoladas da glândula digestiva, já foi sugerido que a depleção de GSH (30-40 %) *per se* não aparenta levar a um desequilíbrio entre os processos antioxidantes e pró-oxidantes (CANESI et al., 2000). Entretanto, os dois primeiros estudos citados demonstram que depleção de GSH pode diminuir a resiliência celular mediante um segundo

insulto, o qual poderia ser o caso durante insultos oxidativos ou exposições a patógenos, como estudado nesta tese.

No presente estudo, o BSO depletou com sucesso o conteúdo de GSH entre 21 e 46 % em todos os tecidos analisados (brânquia, glândula digestiva e hemócitos). Inicialmente, com a finalidade de observar se esta depleção poderia causar distúrbios fisiológicos relacionados ao sistema antioxidante, foram realizadas exposições a peróxidos. Os dados indicaram que ostras apresentando significativa diminuição de GSH em seus tecidos foram, de fato, mais susceptíveis à exposição a peróxidos. Uma das principais funções da GSH, e talvez a mais conhecida e estudada, é a sua participação na eliminação de peróxidos em uma reação catalisada por peroxidases (DEPONTE, 2013). Entretanto, os efeitos de uma moderada depleção sistêmica de GSH neste processo bioquímico ainda são pouco conhecidos em bivalves. Neste estudo, menores níveis de GSH nos tecidos das ostras afetaram de maneira marcante a susceptibilidade destes organismos a um peróxido orgânico (CHP). Este aumento da taxa de mortalidade de ostras pode estar relacionado a uma menor capacidade de detoxificação de peróxidos devido à falta de quantidades suficientes de GSH, o que já foi demonstrado tanto em estudos *in vitro* (LIDDELL et al., 2006), quanto *in vivo* (TREVISAN et al., 2014). Contudo, cabe salientar que as células também contam com outros sistemas de degradação de peróxidos orgânicos que não dependem de GSH, como as 2-Cis-Prxs. Sendo assim, não se sabe ao certo o quanto da capacidade de detoxificar peróxidos orgânicos é de fato afetada em organismos apresentando depleção sistêmica de GSH.

Diferentemente de peróxidos orgânicos, a eliminação de H_2O_2 conta com a ação da Cat, além dos sistemas da GPx e Prx (HALLIWELL;GUTTERIDGE, 2007). A Cat possui uma baixa afinidade por seu substrato e um alto poder catalítico, contribuindo assim para uma eficiente detoxificação de H_2O_2 , principalmente em concentrações muito acima das encontradas fisiologicamente (GEORGE, 1949), como as utilizadas neste estudo. As enzimas GPx e Prx, apesar de apresentarem uma eficiência catalítica semelhante à Cat, são menos efetivas na eliminação de altas concentrações de H_2O_2 devido ao passo limitante de reciclagem de GSH/Trx e a tendência das Prxs se superoxidarem nestas circunstâncias (VEAL; DAY; MORGAN, 2007; WINTERBOURN, 2013). Dessa forma, a GPx e Prx teriam um papel menos expressivo no cenário de exposição ao H_2O_2 utilizado neste trabalho. Mesmo com a presença da Cat, a qual não depende da GSH para a detoxificação do H_2O_2 , ostras tratadas com BSO foram mais

sensíveis à exposição a este peróxido. Entretanto, esta sensibilidade não ocorreu de uma maneira tão acentuada como aquela encontrada com a exposição ao CHP. Nosso grupo de pesquisa já observou que a depleção de GSH em ostras e mexilhões, em conjunto com inibição da GR e TrxR, afetam negativamente a taxa de eliminação de peróxido *in vivo* e, como consequência, aumentam a taxa de mortalidade induzida por estresse oxidativo (TREVISAN et al., 2012; TREVISAN et al., 2014).

Apesar dos tratamentos *in vivo* com BSO reduzirem os níveis de GSH em hemócitos, algumas de suas funções e parâmetros associados permaneceram inalterados. Em conformidade com os dados deste trabalho, o estudo anterior (Estudo 2) indicou que a depleção *in vitro* de praticamente 100 % dos níveis de GSH em hemócitos não foi capaz de afetar a taxa de fagocitose, adesão celular, produção de ERO após imunestimulação e viabilidade de hemócitos de *C. gigas*. Entretanto, quando a depleção de GSH foi combinada com inibição das enzimas GR e TrxR a imunocompetência dos hemócitos foi afetada (MELLO et al., 2015) (Estudo 2). Entretanto, estes resultados foram obtidos a partir de estudos com o composto CDNB, o qual pode promover outros efeitos celulares além da depleção de GSH, sendo estes inconclusivos a cerca da importância da GSH para o sistema imune de bivalves. Esta limitação foi contornada no presente estudo pela utilização do BSO como um agente depletor específico de GSH, e novamente, os menores níveis de GSH não causaram nenhum efeito significativo nas funções celulares dos hemócitos. Estes resultados estão, portanto, em conformidade com os dados do Estudo 2 (MELLO et al., 2015), assim como com os estudos discutidos anteriormente que também utilizaram o BSO em bivalves (CANESI et al., 2000; CONNERS; RINGWOOD, 2000; RINGWOOD; CONNERS, 2000)

A GSH é uma importante e abundante molécula localizada em diferentes compartimentos intracelulares, participando de diferentes eventos biológicos. A GSH está envolvida na redução de peróxidos, conjugação com compostos eletrofílicos e manutenção do potencial redutor das células, as quais representam as funções mais classicamente estudadas da GSH; assim como na síntese de DNA e enovelamento correto das proteínas, entre outros processos, os quais representam vias essenciais para homeostase celular (DEPONTE, 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; MEISTER; ANDERSON, 1983). Em vista da ampla gama de processos que a GSH participa, é previsto que a depleção desta molécula cause graves disfunções celulares. Entretanto, uma pesquisa mais minuciosa na literatura revela que organismos de diferentes filos podem sobreviver à depleção parcial sistêmica de GSH

(ERIKSSON et al., 2015), provavelmente devido à existência de mecanismos compensatórios (ERIKSSON et al., 2015). Efetivamente, camundongos com bloqueio da expressão constitutiva da enzima GR, responsável pela redução de GSSG à GSH, são considerados viáveis e não apresentam alterações hematológicas ou histológicas (YAN et al., 2012). Entretanto, quando estes animais são submetidos a um desafio bacteriano, 100 % de mortalidade foi observada, enquanto que animais do tipo selvagem apresentaram uma alta taxa de sobrevivência (YAN et al., 2012). De maneira similar, nossos dados indicam que a depleção parcial de GSH não induz a mortalidade de ostras ou anormalidades celulares em parâmetros associados às suas células imunes, porém torna as ostras mais susceptíveis a danos oxidativos e infecções. Desta forma, em um contexto *in vivo*, a GSH parece ser substancialmente relevante para o sistema de defesa imunológica de ostras durante infecções bacterianas. De fato, Eriksson e colaboradores (2015) discutem que apesar da homeostase celular ser mantida em camundongos não expressando os sistemas regeneradores de GSH e Trx, estes animais estão possivelmente “à beira do fracasso” no que diz respeito à regulação de seu metabolismo e funcionamento celular. Este contexto aparenta ser verdadeiro para ostras com uma depleção parcial de GSH, uma vez que a mortalidade de ostras aumenta na presença de um segundo fator de estresse, seja ele oxidativo ou uma infecção bacteriana.

Durante infecções bacterianas, os eventos de reconhecimento e resposta imunológica envolvem diversas reações bioquímicas e celulares, incluindo respostas inflamatórias, as quais podem promover danos teciduais através de processos como morte celular, atrofia e degeneração (CARELLA et al., 2015). Desta forma, durante a exposição e recuperação de uma infecção bacteriana, o hospedeiro deve ser constantemente capaz de reparar tais danos, o que pode depender de mecanismos antioxidantes uma vez que estes danos estão frequentemente associados a eventos oxidativos (FAROOQUI; FAROOQUI, 2011; KISS, 2010; TRACHOOTHAM et al., 2008). Já foi reportado em bivalves que a exposição avibriosaumenta a transcrição gênica, expressão e atividade enzimática de muitas enzimas antioxidantes (CANESI et al., 2010; GENARD et al., 2013; HUAN; WANG; LIU, 2011). Estas descobertas estão de acordo com a ideia de que o sistema antioxidante age de maneira conjunta com o sistema imunológico durante as infecções bacterianas e o restabelecimento pós-infecção. No presente estudo, a maior susceptibilidade de ostras com depleção de GSH não esteve relacionada com a perda de imunocompetência de hemócitos. Desta forma, não foi possível

estabelecer uma relação direta entre a manutenção dos níveis de GSH e a eliminação de bactéria pelos hemócitos. Ainda assim, a depleção de GSH afetou notavelmente a susceptibilidade de ostras a infecções por vibrios. Desta forma, é sugerido que a depleção sistêmica de GSH (*i.e.* brânquias, glândula digestiva e hemócitos) possa exacerbar o dano celular e dificultar uma eficiente recuperação do organismo durante e após a infecção, em vez de afetar diretamente a imunocompetência das ostras.

A maior susceptibilidade de ostras a bactérias, gerada por influência do menor conteúdo de GSH, pode ser particularmente relevante para bivalves, uma vez que estes organismos são expostos a diferentes fatores capazes de modular os níveis de GSH. Já foi descrita a depleção de GSH em bivalves após exposição a metais (KOVÁŘOVÁ; SVOBODOVÁ, 2009), óleo diesel (MARQUES et al., 2014), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (GRINTZALIS; GEORGIU; DAILIANIS, 2012), misturas complexas de poluentes (JENA; VERLECAR; CHAINY, 2009; MACHADO et al., 2014; WAN et al., 2015), elevada temperatura da água (DOWNS et al., 2000) e elevada pCO₂ (WANG et al., 2015). Ademais, desde 2008, o aparecimento de eventos de mortalidade massiva de *C. gigas* tem aumentado em termos de intensidade e distribuição geográfica (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015). Como discutido anteriormente, estudos sugerem que estas mortalidades não podem ser explicadas por apenas um único, mas sim por um conjunto complexo de fatores, os quais podem interagir com o estado fisiológico e/ou genético do organismo, fatores ambientais e de estresse, e a presença de patógenos virais e bacterianos (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; EFSA, 2010; ROMALDE; BARJA, 2010). Inclusive, já foi sugerido que a presença de alguns contaminantes ambientais está associada a esses eventos de mortalidade, atuando em sinergismo com infecções virais e bacterianas (BARBOSA-SOLOMIEU; RENAULT; TRAVERS, 2015; GAGNAIRE et al., 2007; MOREAU et al., 2015; MORLEY, 2010). Tendo em vista esta conjuntura, este trabalho corrobora a possibilidade de interações sinérgicas entre agentes químicos que causam a depleção de GSH e patógenos. Caso confirmado, estes dados indicariam que a poluição poderia realmente tornar as ostras mais susceptíveis a infecções bacterianas, o que poderia contribuir com as mortalidades massivas observadas nos últimos anos.

De maneira geral, este trabalho utilizou a depleção da GSH para investigar se o sistema antioxidante poderia atuar de maneira conjunta com o sistema imunológico na defesa de ostras contra patógenos de

origem bacteriana. A GSH foi escolhida por ser uma importante defesa antioxidante, o que ficou evidenciado a partir do aumento na mortalidade de ostras expostas a peróxidos após depleção moderada de GSH (20-40 %). Este consumo de GSH não interferiu nos parâmetros hematológicos, na viabilidade celular ou na imunocompetência dos hemócitos, mas aumentou a mortalidade de ostras expostas avíbrios. Os mecanismos causais desta mortalidade ainda precisam ser esclarecidos. Entretanto, é proposto que, devido à falta de distúrbios celulares nos hemócitos, a GSH parece ser essencial para a manutenção da função fisiológica geral das ostras durante eventos de infecção, auxiliando no reparo de eventuais danos celulares e contribuindo para a recuperação do hospedeiro após a infecção.

CONCLUSÕES

Este trabalho, de maneira geral, contribuiu com o conhecimento sobre os sistemas de defesa imune e antioxidante de ostras, assim como o potencial risco à saúde das mesmas devido à presença de microrganismos patogênicos na costa de Santa Catarina.

- ❖ Com relação aos potenciais riscos à saúde das ostras presentes na costa de Santa Catarina, o presente trabalho apresentou evidências de que:
 - A presença do vírus OsHV-1 e da bactéria *V. splendidum* em várias localidades da costa de Santa Catarina representa um alerta para o setor da aquicultura. Estes patógenos estão fortemente associados a mortalidades massivas de ostras em outros países, as quais ainda não ocorrem no Brasil. Este estudo evidencia a necessidade de ações que previnam a ocorrência destes surtos de mortalidade no estado e no país.

- ❖ Com relação às defesas antioxidantes, o presente trabalho apresentou evidências de que:
 - Hemócitos possuem a capacidade de detoxificar compostos eletrofílicos, o que foi evidenciado pela depleção de GSH após exposição ao CDNB;
 - Hemócitos são bastante resistentes a distúrbios nos níveis de GSH, uma vez que sua total depleção não diminuiu a atividade metabólica normal (redução do MTT) destas células, apesar de afetar a estabilidade da membrana lisossomal (retenção do VN);
 - O correto funcionamento do sistema da Prx/Trx/TrxR é particularmente importante para a função dos hemócitos, uma vez que a inibição da TrxR aparentou ser o gatilho que desencadeou a disfunção destas células;
 - A GSH é fundamental para a proteção de ostras mediante exposição a compostos pró-oxidantes, pois uma diminuição parcial de ~30 % nos níveis de GSH foi capaz de aumentar em até 50 % a mortalidade de ostras expostas a peróxidos.

- ❖ Com relação ao sistema imune das ostras, o presente trabalho apresentou evidências de que:
 - Hemócitos conseguem desempenhar algumas de suas principais funções (adesão, fagocitose e produção de ERO após imunoestimulação) mesmo com os níveis intracelulares de GSH depletados;
 - As ostras da espécie *C. gigas* presentes em Santa Catarina são particularmente resistentes a diferentes cepas de víbrios, uma vez que foram necessárias exposições a elevadas cargas bacterianas para causar mortalidades significativas, o que ocorreu apenas com duas das cinco espécies testadas;
 - A GSH é fundamental para a proteção de ostras contra infecções por bactérias patogênicas para bivalves, a exemplo da espécie *V. anguillarum*, pois uma diminuição de ~30 % dos níveis de GSH aumentou a mortalidade em 33 %.

PERSPECTIVAS

O estudo que investigou a presença de vírus e bactérias patogênicos para ostras em Santa Catarina, representa um trabalho preliminar, o qual deve ser continuado a fim de caracterizar melhor as espécies detectadas. Seriam necessárias novas análises de sequenciamento comparando diversas amostras, a fim de identificar a cepa de *V. splendidus* e a variante do OsHV-1 presentes em Santa Catarina, através de análises filogenéticas utilizando sequências disponíveis em bancos de dados virtuais. Técnicas como microscopia eletrônica de transmissão e hibridização *in situ* poderiam também auxiliar para uma melhor caracterização das infecções por estes patógenos (*e.g.* tecidos-alvo e possíveis danos celulares/teciduais). O isolamento destes patógenos também seria útil no estudo da capacidade de virulência dos mesmos. Ademais, seria de grande relevância e importância o desenvolvimento de projetos de extensão envolvendo a UFSC e produtores de ostras, com a finalidade de alertá-los quanto aos possíveis riscos aos cultivos e oferecer alternativas quanto ao manejo adequado das ostras a fim de evitar situações de estresse para estes animais.

Os estudos que visaram compreender a importância de parâmetros associados ao sistema antioxidante na imunocompetência das ostras também abrem caminho para uma ampla gama de estudos futuros. Podem ser usados outros inibidores específicos de enzimas associadas ao sistema antioxidante, como por exemplo, a TrxR, devido à forte evidência de sua importância para a manutenção das funções dos hemócitos. Talvez a inibição desta enzima trouxesse consequências mais drásticas na sobrevivência das ostras durante infecções bacterianas. Uma vez que foi observado que a GSH é importante para a sobrevivência das ostras contra desafios bacterianos, outra abordagem seria observar se uma indução dos níveis basais de GSH poderia torná-las mais resistentes. Este estudo seria de particular interesse para a maricultura, já que existem compostos naturais capazes de estimular a síntese de GSH, como, por exemplo, a curcumina (açafrão). Por fim, visto que a depleção parcial de GSH torna as ostras mais susceptíveis a infecções bacterianas, seria interessante expor as ostras a contaminantes ambientais conhecidos por afetar os níveis de GSH em concentrações ambientalmente relevantes e, posteriormente, avaliar a susceptibilidade das mesmas a essas infecções. Tais estudos colaborariam com a crescente área da ecotoxicologia, ligando os efeitos de xenobiontes ao

risco de sobrevivência desses animais em seu habitat natural e nos cultivos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. Y. et al. Total body glutathione depletion induces oxidative stress and disrupts the immune function in mice. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 157–170, 16 jul. 2011.

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine pollution bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875–85, ago. 2005.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 373–82, jan. 1981.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–402, 1 set. 1997.

ARMITAGE, S. A. O.; PEUSS, R.; KURTZ, J. Dscam and pancrustacean immune memory - a review of the evidence. **Developmental and comparative immunology**, v. 48, n. 2, p. 315–23, fev. 2015.

ARNÉR, E. S.; BJÖRNSTEDT, M.; HOLMGREN, A. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3479–82, 24 fev. 1995.

ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6102–6109, 25 out. 2000.

ARNÉR, E. S.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in enzymology**, v. 300, p. 226–39, jan. 1999.

BARBOSA-SOLOMIEU, V. et al. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. **Journal of virological methods**, v. 119, n. 2, p. 65–72, ago. 2004.

BARBOSA-SOLOMIEU, V.; RENAULT, T.; TRAVERS, M.-A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 2–10, out. 2015.

BATISTA, F. M. et al. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review. **Journal of Virological Methods**, v. 139, n. 1, p. 1–11, jan. 2007.

BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K.-H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. **Biochimie**, v. 89, n. 9, p. 1107–12, set. 2007.

BEN-HORIN, T. et al. Parasite transmission through suspension feeding. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 155–176, out. 2015.

BERRIDGE, M. V; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127–52, 1 jan. 2005.

BILZER, M. et al. Interaction of a glutathione S-conjugate with glutathione reductase. Kinetic and X-ray crystallographic studies. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 138, n. 2, p. 373–8, 16 jan. 1984.

BOEHS, G. et al. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, n. 1, p. 43–7, jan. 2010.

BOWER, S. M.; MCGLADDERY, S. E.; PRICE, I. M. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1–199, jan. 1994.

BRAMBLE, L.; ANDERSON, R. S. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, n. 4, p. 337–348, jul. 1997.

BRASIL. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos - 2013**. Brasília. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2013>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 9, p. 1239–53, 1 nov. 2009.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.

BULLER, N. B. **Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic**

Animals, 2nd Edition: A Practical Identification Manual. CABI, 2014.

CANESI, L. et al. Growth factor-mediated signal transduction and redox balance in isolated digestive gland cells from *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 125, n. 3, p. 355–63, mar. 2000.

CANESI, L. et al. Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 152, n. 3, p. 399–406, set. 2010.

CARELLA, F. et al. Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 107–20, out. 2015.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 484–90, jan. 1985.

CHENG, T. C.; SULLIVAN, J. T. Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan hemocytes. **Marine Environmental Research**, v. 14, n. 1-4, p. 305–315, jan. 1984.

CHIA, A. J. L. et al. Differential effect of covalent protein modification and glutathione depletion on the transcriptional response of Nrf2 and NF-kappaB. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 410–21, 1 ago. 2010.

CIACCI, C. et al. Immunomodulation by different types of N-oxides in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36937, jan. 2012.

COEN, L. D.; BISHOP, M. J. The ecology, evolution, impacts and management of host-parasite interactions of marine molluscs. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 177–211, out. 2015.

COMESAÑA, P. et al. Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 109, n. 3, p. 274–86, mar. 2012.

CONAMA. **Resolução 357/2005 - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**, 2005.

CONNERS, D.; RINGWOOD, A. . Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 4, p. 341–349, out. 2000.

CROSS, A. Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: Mechanisms of action and methods for their elucidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 71–93, 1990.

CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1657, n. 1, p. 1–22, 28 jun. 2004.

CUNHA, A. C. L. et al. First report of *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea gigas* in South America. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2016. (submetido)

DA SILVA, P. M.; MAGALHÃES, A. R. M.; BARRACCO, M. A. Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 92, n. 03, p. 571–579, jul. 2011.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 6, p. 883–98, 15 set. 2007.

DE MELO, A. G. C. et al. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 3, p. 564–72, jul. 2010.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3217–66, maio 2013.

DISCOVER LIFE. **Global Mapper**. Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map>. Acesso em: 12 jan. 2016.

DOMAZOU, A. S. et al. Repair of Protein Radicals by Antioxidants. **Israel Journal of Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 254–264, 13 mar. 2014.

DONAGHY, L. et al. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. **Aquaculture**, v. 297, n. 1-4, p. 10–24, dez. 2009.

DONAGHY, L. et al. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 1, p. 91–97, 5 nov. 2014.

DOWNS, C. A. et al. A Molecular Biomarker System for Assessing the Health of Coral (*Montastraea faveolata*) During Heat Stress. **Marine Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 533–544, 1 nov. 2000.

DRÖGE, W. et al. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. **FASEB journal**, v. 8, n. 14, p. 1131–8, nov. 1994.

DRÖGE, W.; BREITKREUTZ, R. Glutathione and immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 04, p. 595–600, 28 fev. 2007.

EFSA. Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **EFSA Journal** 2010, v. 8, n. 11, nov. 2010.

EFSA AHAW PANEL. EFSA Panel on Animal Health and Welfare: Scientific opinion on oyster mortality. **EFSA Journal** 2015, v. 13, n. 6, mai. 2015.

ELSTON, R. A. Bivalve mollusc viruses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 393–403, 1997.

EPAGRI. **Síntese Informativa da Maricultura 2014**. Florianópolis. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese_informativa_da_maricultura_2014.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2015.

ERIKSSON, S. et al. Dietary methionine can sustain cytosolic redox homeostasis in the mouse liver. **Nature communications**, v. 6, p. 6479, 20 jan. 2015.

FATMA. **Histórico de Balneabilidade**. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/laboratorio/dlg_balneabili-dade2.php>. Acesso em: 05 jan. 2016.

FAO. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. Rome.

FAO. **Fishery and Aquaculture Statistics**. Rome.

FAO. **Fisheries and Aquaculture Department. Species Fact Sheets -**

Crassostrea gigas. Disponível em:

<<http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. (EDS.). **Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling**. John Wiley & Sons, 2011.

FLORES-NUNES, F. et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 22, p. 17386–17396, nov. 2015.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, n. 12 Pt 2, p. S4–8, 15 dez. 2002.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant cell**, v. 17, n. 7, p. 1866–75, 1 jul. 2005.

FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 10, p. 1303–14, 7 out. 2009.

FRIES, C. R.; TRIPP, M. R. Depression of phagocytosis in mercenaria following chemical stress. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 4, p. 233–244, jan. 1980.

GAGNAIRE, B. et al. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquatic toxicology**, v. 84, n. 1, p. 92–102, 15 ago. 2007.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C. Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 117–125, out. 2003.

GAY, M. et al. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. **Diseases of aquatic organisms**, v. 62, n. 1-2, p. 65–74, 23 nov. 2004.

GAY, M.; BERTHE, F. C. J.; LE ROUX, F. Screening of *Vibrio* isolates to

develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 59, n. 1, p. 49–56, 21 abr. 2004.

GENARD, B. et al. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e64534, jan. 2013.

GEORGE, P. The effect of the peroxide concentration and other factors on the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. **The Biochemical journal**, v. 44, n. 2, p. 197–205, jan. 1949.

GIRÓN-PÉREZ, M. I. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, p. 149–156, 2010.

GREEN, T. J.; BARNES, A. C. Inhibitor of REL/NF-KappaB is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n. 2, p. 260–5, ago. 2009.

GRINTZALIS, K.; GEORGIU, C. D.; DAILIANIS, S. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. **Marine Environmental Research**, v. 81, p. 26–34, out. 2012.

GRUNDY, M. M. et al. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 273–290, abr. 1996.

HADDAD, J. J.; HARB, H. L. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Molecular immunology**, v. 42, n. 9, p. 987–1014, maio 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53–58, fev. 1989.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent

enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free radical research**, v. 31, p. 273–300, 1999.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, n. 2, p. 237–248, set. 2003.

HEISS, E.; GERHÄUSER, C. Time-dependent modulation of thioredoxin reductase activity might contribute to sulforaphane-mediated inhibition of NF-kappaB binding to DNA. **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, n. 11–12, p. 1601–11, 15 jan. 2005.

HINCHMAN, C. A.; BALLATORI, N. Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 41, n. 4, p. 387–409, abr. 1994.

HOUSE, R. V.; LUEBKE, R.; KIMBER, I. **Immunotoxicology and Immunopharmacology, Third Edition**. 3rd. ed. CRC Press, 2006.

HUAN, P.; WANG, H.; LIU, B. Comparative proteomic analysis of challenged Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): a new insight into the anti-*Vibrio* immune response of marine bivalves. **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 6, p. 1186–92, dez. 2011.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research**, v. 9, n. 9, p. 868–77, out. 1999.

IBGE. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2013**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/monitoramento-e-controle/informacoes-e-estatisticas>>. Acesso em: 13 dez. 2015.

IMRICH, A.; KOBZIK, L. Fluorescence-based measurement of nitric oxide synthase activity in activated rat macrophages using dichlorofluorescein. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 1, n. 4, p. 359–69, ago. 1997.

ISAKSSON, C. Pollution and its impact on wild animals: a meta-analysis on oxidative stress. **EcoHealth**, v. 7, n. 3, p. 342–50, set. 2010.

JENA, K. B.; VERLECAR, X. N.; CHAINY, G. B. N. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 107–

113, jan. 2009.

JOCELYN, P. C. Spectrophotometric assay of thiols. **Methods in enzymology**, v. 143, p. 44–67, jan. 1987.

KEHRER, J. P.; LUND, L. G. **Cellular reducing equivalents and oxidative stress** *Free Radical Biology and Medicine*, 1994.

KIM, J.-M. et al. Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 1, p. 101–108, dez. 2004.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 44–50, 1 jan. 2007.

KISS, T. Apoptosis and its functional significance in molluscs. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 15, n. 3, p. 313–21, mar. 2010.

KITANI, K. et al. Ursodeoxycholic acid reduces the systemic toxicity of 1,2-dichloro,4-nitrobenzene by stimulating hepatic glutathione S-transferase in mice. **Life sciences**, v. 54, n. 14, p. 983–9, jan. 1994.

KOVÁŘOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, Z. Can thiol compounds be used as biomarkers of aquatic ecosystem contamination by cadmium? **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 3, p. 177–83, set. 2009.

KRANCE, S. M. et al. Transient glutathione depletion determines terminal differentiation in HL-60 cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 1, p. 53–60, jan. .

KWON, M.-G. et al. Morphological and immunological characterization of the haemocytes of the oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Fish Pathology**, v. 19, n. 3, p. 243–251, 2006.

LAGO, E. P.; NIETO, T. P.; FARTO SEGUÍN, R. Fast detection of *Vibrio* species potentially pathogenic for mollusc. **Veterinary microbiology**, v. 139, n. 3-4, p. 339–46, 18 nov. 2009.

LANE, E.; BIRKBECK, T. H. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. **Journal of Fish Diseases**, v. 23, n. 4, p. 275–279, jul.

2000.

LAUCKNER, G. **Diseases of mollusca: Bivalvia**. ed. Hamburg: Biologische Anstalt Helgola, 1983.

LE, F. et al. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. v. 15, p. 251–258, 2002.

LEAL DIEGO, A. G. et al. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**, v. 72, p. 93–100, fev. 2013.

LEE, S. K. Y. et al. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 5, p. 412–20, maio 2002.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annual review of physiology**, v. 68, p. 253–78, 6 jan. 2006.

LIDDELL, J. R. et al. Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity. **Journal of neuroscience research**, v. 84, n. 3, p. 578–86, ago. 2006.

LITTLEPAGE, J.; POLI, C. R. **Oyster culture in the state of Santa Catarina, Brazil : Final report of the Shellfish Technology Transfer Program**. Florianópolis: Blue Water Aquaculture Ltda, 1999.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–53, maio 2013.

MACHADO, A. A. DE S. et al. Responses of biomarkers in wild freshwater mussels chronically exposed to complex contaminant mixtures. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 7, p. 1345–1358, 5 jul. 2014.

MAGALHAES, A. R. M.; FERREIRA, J. F. Patologias e manejo em malacocultura. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa. p. 79–94. 2006

MARQUES, J. A. et al. Antioxidant defense responses in *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) exposed to an experimental diesel oil spill in Paranaguá Bay (Paraná, Brazil). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 107, p. 269–75, set. 2014.

MARTENOT, C. et al. Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of virological methods**, v. 170, n. 1-2, p. 86–9, dez. 2010.

MARTENOT, C. et al. Detection of undescribed ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) specimens from Pacific oyster, *i. Journal of Invertebrate Pathology*, v. 132, p. 182–189, nov. 2015.

MEDEIROS, S. C. **Detecção de perda de ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada na praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2012.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v. 52, p. 711–60, 28 jan. 1983.

MELLO, D. F. et al. How important are glutathione and thiol reductases to oyster hemocyte function? **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 566–72, 22 out. 2015.

MITOZO, P. A. et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 1, p. 69–77, 1 jul. 2011.

MOREAU, P. et al. Pesticides and Ostreid Herpesvirus 1 Infection in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130628, 24 jun. 2015.

MORLEY, N. J. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 96, n. 1, p. 27–36, 21 jan. 2010.

MOSS, J. A. et al. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of Southern China. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 55, n. 2, p. 117–30, jan. 2008.

NASCIMENTO, I. A. et al. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, n. 3, p. 340–349, maio 1986.

NASFI, H. et al. A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 461–75, mar. 2015.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, dez. 2001.

OLIVEIRA, G.; SCAZUFCA, P.; AROUCA, L. F. A. F. **Ranking do Saneamento - Instituto Trata Brasil**. São Paulo. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/estudos/ranking/relatorio-completo-2014.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2016.

PADGAONKAR, V. A. et al. Thioredoxin Reductase Activity may be More Important than GSH Level in Protecting Human Lens Epithelial Cells against UVA Light. **Photochemistry and photobiology**, 15 dez. 2014.

PAILLARD, C.; ROUX, F. LE; BORREGO, J. J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. v. 498, p. 477–498, 2004.

PARISI, M.-G. et al. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 6, p. 834–40, dez. 2008.

PEPIN, J. F.; RIOU, A; RENAULT, T. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. **Journal of virological methods**, v. 149, n. 2, p. 269–76, mai. 2008.

PERNET, F. et al. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. **Aquaculture Environment Interactions**, v. 2, n. 3, p. 215–237, jun. 2012.

PICHAUD, N. et al. Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*. **Chemistry Central journal**, v. 2, p. 23, jan. 2008.

PINEDA-MOLINA, E. et al. Glutathionylation of the p50 Subunit of NF- κ B: a Mechanism for Redox-Induced Inhibition of DNA Binding †. **Biochemistry**, v. 40, n. 47, p. 14134–14142, nov. 2001.

POIRIER, A. C. et al. Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. **The Journal of biological chemistry**, M114.576546, jul. 2014.

POLI, C. R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*, 1852). In: POLI, C. R. et al. (Eds.). . **Aquicultura: experiências brasileiras**. 1. ed.

[s.l.] Multirefá Editora Ltda, 2004. p. 251–256.

PONTINHA, V. D. A. **Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973) cultivada em Florianópolis/SC**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

PRUZZO, C.; GALLO, G.; CANESI, L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 6, p. 761–72, jun. 2005.

RAMOS, C. DE O. **Ciclo Gonádico da Ostra Nativa *Crassostrea gasar* em Laboratório**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

RAMOS, R. J. et al. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 327–33, jan. 2014.

RENAULT, T.; NOVOA, B. Viruses infecting bivalve molluscs. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 397–409, dez. 2004.

RINGWOOD, A. .; CONNERS, D. . The effects of glutathione depletion on reproductive success in oysters, *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 207–211, jul. 2000.

RISTORI, C. A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International journal of environmental health research**, v. 17, n. 4, p. 259–69, ago. 2007.

ROMALDE, J. L.; BARJA, J. L. Bacteria in molluscs: good and bad guys. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 136–147, 2010.

ROUX, F. LE et al. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 13 ago. 2015.

SABRY, R. C.; MAGALHÃES, A. R. M. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 194–203, set. 2005.

SAULNIER, D.; DE DECKER, S.; HAFFNER, P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 2, p. 191–7, maio 2009.

SAWABE, T. et al. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 414, 27 jan. 2013.

SCHMITT, P. et al. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. In: QIN, J. G. (Ed.). . **Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality**. [s.l.] Nova Science Publishers, Inc., 2011. p. 227–273.

SEGAL, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 4, p. 604–18, jan. 2008.

SEYFRIED, J.; WÜLLNER, U. Inhibition of thioredoxin reductase induces apoptosis in neuronal cell lines: role of glutathione and the MKK4/JNK pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 359, n. 3, p. 759–64, 3 ago. 2007.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 916–921, nov. 1999.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 1 jan. 2011.

SILVEIRA, N. Predadores, incrustantes e enfermidades. In: **Manual De Cultivo De Ostras - Laboratório De Cultivo De Moluscos Marinhos**. 1997. p. 39–55.

SINCERO, T. C. M. et al. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water research**, v. 40, n. 5, p. 895–902, mar. 2006.

SINDERMANN, C. J. **Principal diseases of marine fish and shellfish**. San Diego: Academic Press, 1990.

SONG, L. et al. Bivalve immunity. In: SÖDERHÄLL, K. (Ed.). . **Invertebrate Immunity**. New York: Landes Bioscience and Springer

Science+Business Media, 2010. p. 44–65.

SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 76, n. 2, p. 153–61, fev. 2012.

SUN, J. C.; UGOLINI, S.; VIVIER, E. Immunological memory within the innate immune system. **The EMBO journal**, v. 33, n. 12, p. 1295–303, 17 jun. 2014.

TERAHARA, K.; TAKAHASHI, K. G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 2, p. 131–7, jan. 2008.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, mar. 1969.

TIPPLE, T. E.; ROGERS, L. K. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 889, p. 315–24, jan. 2012.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343–74, 30 ago. 2008.

TRAVERS, M.-A. et al. Bacterial diseases in marine bivalves. **Journal of invertebrate pathology**, v. 131, p. 11–31, jul. 2015.

TREVISAN, R. et al. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 108, p. 85–93, fev. 2012.

TREVISAN, R. et al. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Marine environmental research**, v. 101, p. 81–90, out. 2014.

TREVISAN, R. et al. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. **Aquatic Toxicology**, jan. 2016.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular cell**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 13 abr. 2007.

VILLALBA, A. et al. Perkinsosis in molluscs: A review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 411–432, 15 dez. 2004.

WAN, R. et al. Biochemical responses in the gills of *Meretrix meretrix* after exposure to treated municipal effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 78–85, jan. 2015.

WANG, Q. et al. Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Fish & shellfish immunology**, v. 49, p. 24–33, 17 dez. 2015.

WAREING, C. J. et al. Increased levels of alpha-class and pi-class glutathione S-transferases in cell lines resistant to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 217, n. 2, p. 671–6, 15 out. 1993.

WINTERBOURN, C. C. **Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part C**. Elsevier, 2013.

WU, H. et al. Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum*. **Journal of proteomics**, v. 94, p. 54–67, 6 dez. 2013.

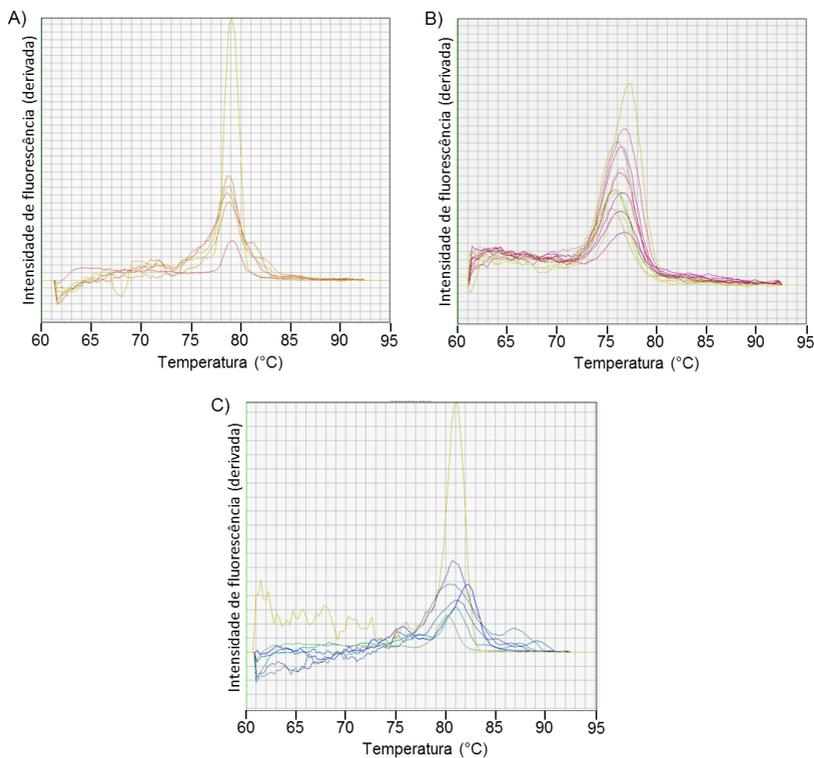
YAN, J. et al. Glutathione reductase facilitates host defense by sustaining phagocytic oxidative burst and promoting the development of neutrophil extracellular traps. **Journal of immunology**, v. 188, n. 5, p. 2316–27, 1 mar. 2012.

ZHANG, S.-M. et al. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5681, p. 251–4, 9 jul. 2004.

ZHANG, T. et al. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Developmental and comparative immunology**, v. 45, n. 1, p. 141–150, 6 mar. 2014.

ANEXO A

Figura 1. Curvas de fusão obtidas após reação de amplificação por qPCR com os iniciadores (A) VSPN-F/VSPN-R, (B) VTS/VS e (C) C9/C10.



Os picos de maior intensidade representam os controles positivos obtidos a partir de ostras infectadas com *V. splendidus* (A e B) ou OsHV-1 (C). Os picos restantes representam amostras de DNA de ostras coletadas em diferentes locais de Santa Catarina que apresentaram amplificação.

ANEXO B

Figura 1. Alinhamento entre as sequências obtidas com os iniciadores VSPN-F (senso) e VSPN-R (anti-senso). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

VSPN_F      GATGTAGTTAAAGCCAGAGCACGTCCACCAGCAGATTCAATAGCATCAACGGTTTTTCGT
VSPN_R      -----CNNANNGTAGTTTC-----
                *      * * * * *

VSPN_F      GCCGCTTCGAGATTGATATCAGCGATACCAACCGCTGCACCTGCTTTTGCATAGATTTCA
VSPN_R      -----

VSPN_F      GCGATGTCACGTCCTATACCATTTGCAGAGCCAGTGACCAATGCTACTTTGCCTGTCAAA
VSPN_R      -----

VSPN_F      TCTTGGTTATAATTGGGTCGCCATACATATTGATTTAGTTAAAGCCGGAGTAGTTAATAAC
VSPN_R      -----

VSPN_F      AGAGTAAGTTATTGTTTAAAGCTTTTTGGATTAAAGCTTTTTGCAATATGCTAAGTTGCA
VSPN_R      -----GATAAGCTTTTGTCTTTATGCTCTTTTACAATTTGGAAAGCTGAC
                * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

VSPN_F      AGATGGAAAGATGTACGAGTAATTCAATCAAAGTAAAACGTTCAAAATGAAAAGTTGCCA
VSPN_R      TGATTGATTTCTTACAATAATTCCATCCAATTTTAAAAATCCCCATGGTTAACCCTGCTC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

VSPN_F      AAGTTATTAAAGCACGGTATAAACCAACAAACACATCAAGTGTCTG-----
VSPN_R      TTAATAAATACAACCGGTATTTCAATGTAATGCATCAATTTGCTTGTATTTCGATTCAC
                * *      * * * *      * * * * * * * * * * * * * * *

VSPN_F      -----TATCGATCAAACGTGATGTTGANN
VSPN_R      ACTTGATTGAATCACAATTGAATCAGGCAACAGTTATCAG--
                * * * *      * * * * * * * * * *

```

Figura 2. Alinhamento entre as sequências obtidas com os iniciadores VTS (senso) e VS (anti-senso). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega (1.2.1). * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

VTS      AGCGGAAACGACACTAACAATCCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGT
VS      -----NNTGGGGGCTATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGT
                * * * * *
VTS      GAGTAATGCCTAGGAAATGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATA
VS      GAGTAATGCCTAGGAAATGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATA
                * * * * *
VTS      CCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCC
VS      CCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCC
                * * * * *
VTS      TAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
VS      TAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
                * * * * *
VTS      CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
VS      CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
                * * * * *
VTS      CAGTGGGGAATATGACACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
VS      CAGTGGGGAATATGACACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
                * * * * *
VTS      AGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTG-CAGTGGACAAATNAA-----
VS      AGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGTAGCGTTAATAGGCTAT
                * * * * *
VTS      -----
VS      CTCTT

```

Figura 3. Alinhamento entre a sequência obtida com o iniciador VSPN-F (senso) e a sequência de maior similaridade com esta segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo *Vibrio splendidus* (AF413024.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

VSPN_F          GATGTAGTTAAAGCCAGAGCACGTCACCCAGCAGATTCAATAGCATCAACGGTTTTTCGT
AF413024.1     -----

VSPN_F          GCCGCTTCGAGATTGATATCAGCGATACCAACCGCTGCACCTGCTTTTGCATAAAGTTTCA
AF413024.1     -----

VSPN_F          GCGATGTCACGTCCTATACCATTTCAGAGCCAGTGACCAATGCTACTTTGCCTGTCAA
AF413024.1     -----

VSPN_F          TCTTGTTATAATTGGGTCGCCATACATATTGATTTAGTTAAAGCCGGAGTAGTTAATAAC
AF413024.1     -----GATTTAGTTAAAGCCAGAGCTTTAATTAAT
                        ***** * * *
VSPN_F          AGAGTAAGTTATTGTTTAAAGCTTTTTGGATTAAAGCTTTTGCATATGCTAAGTTGCA
AF413024.1     AACGTAAGTTATTGATTAAAGCTTTTGGCTTTATGCTCTTTAACAAATTTGGAAAGCTGAC
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSPN_F          AGATGGAAGATGTACGAGTAATTC AATCAAAGTAAACGTTCAAATG-AAAAGTTGCC
AF413024.1     TGATTGAT-TACTTACGAGTAATTC AATCAAATTTAAAGTTCTCAATGTTTATCTGCTC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSPN_F          AAAGTTATTAAGCACGGTATAAACACAAACAAACACATTC AAGTGCTGTATCGATCAAAC
AF413024.1     TTAGTTAATAAGAACGGTATAAACACAAACAAACACATTC AAGTGCTGTAT-----
                        ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSPN_F          TGTAGTTGANN
AF413024.1     -----

```

Figura 4. Alinhamento entre a sequência obtida com o iniciador VSPN-F (senso) e a sequência de maior similaridade com esta segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo *Vibrio splendidus* (FM954972.2). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

VSPN_F          GATGTAGTTAAAGCCAGAGCACGTCACCCAGCAGATTCAATAGCATCAACGGTTTTTCGT
FM954972.2     -----

VSPN_F          GCCGCTTCGAGATTGATATCAGCGATACCAACCGCTGCACCTGCTTTTGCATAAGTTTCA
FM954972.2     -----

VSPN_F          GCGATGTCACGTCCTATACCATTGCGAGCCAGTGACCAATGCTACTTTGCCTGTCAA
FM954972.2     -----

VSPN_F          TCTTGTATAAATGGGTCGCCATACATATTGATTTAGTTAAAGCCGGAGTAGTTAATAAC
FM954972.2     -----GATTTAGTTAAAGCCAGAGCTTTAATTAAT
                        ***** * * * *
VSPN_F          AGAGTAAGTTATTGTTTAAAGCTTTTTGGATTAAAGCTTTTTCGAATATGCTAAGTTGCA
FM954972.2     AACGTAAGTTATTGATTAAAGCTTTTTGCTTTATGCTCTTTAACAAATTTGGAAAGCT---
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSPN_F          AGATGGAAGATGTACGAGTAATTCATCAAAGTAAACGTTCAAATGAAAAGTTGCCA
FM954972.2     -----GACTGATTGATTACTTACGAGTAATTCATCAAATTTAAAGTTCTCA
                        * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSPN_F          AAG-TTATTAAGCACGGTATAAACACRACRAACACATTCAAGTGCTGTATCGAT--CA
FM954972.2     ATGTTTATCTTTCATTAGATAAACACAAACACATTCAAGTGCTTGTATTCGAATCA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VSPN_F          AACTGTAGTTGANN
FM954972.2     AACGTTAGTT---
*** *****

```


Figura 7. Alinhamento entre a sequência obtida com o par de iniciadores VTS/VS e uma das sequências de maior similaridade com esta (uma vez que várias sequências pertencentes a diferentes espécies de *Vibrio* apresentaram 99 % de identidade) segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo *Vibrio splendidus* (AY620972.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

VTS/VS      AGCGGAAACGACACTAACAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGT
AY620972.1  AGCGGAAACGACACTAACAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGT
*****
VTS/VS      GAGTAATGCCTAGGAAATGCCTTGATGTGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATA
AY620972.1  GAGTAATGCCTAGGAAATGCCTTGATGTGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATA
*****
VTS/VS      CCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCC
AY620972.1  CCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCC
*****
VTS/VS      TAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
AY620972.1  TAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
*****
VTS/VS      CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
AY620972.1  CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
*****
VTS/VS      CAGTGGGGAATATGCACAATGGGCACAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
AY620972.1  CAGTGGGGAATATGCACAATGGGCACAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
*****
VTS/VS      AGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGTAGCGTTAATAGGCTAT
AY620972.1  AGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGTAGCGTTAATAGGCTAT
*****
VTS/VS      CTCTT-
AY620972.1  TCTCTT
*
```


Figura 9. Alinhamento entre as sequências obtidas com os iniciadores C9 (senso) e C10 (anti-senso) correspondentes ao produto de ~400 pb. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

C9-400      GAGGGAAATTTGCGAGAGAAGGTTTAGAATGCAGGACTCGGACATGGATGTAATGTCT
C10-400    -----GTTACCTGATCTAGGCCCTGT--AGTAGTAGTT
                                     * * * * *
C9-400      GGCCAAATAACCACAAAGTGATCTGGGATTTCTCTCAGGCTCAGTTGTACGACACACACA
C10-400    CGGGCCAGTAACCGGGGTGATCTGGGATTTCTCTCGCGCTCACTTGTACGACACACACA
          * * * * *
C9-400      GACA-TTCCTGATTCTCAGTGACAGTTCAGACAGTCCGCCAGGTTTACATTACTATGGT
C10-400    GACATTTCTGATTCTCAGTGACAGTTCAAAACAGTCCGCCAGGTATTACATTACTATGGT
          ****
C9-400      TACCATTAGAGGACGCTGGCAGAATTGTATTATCATCATGTGTCAGGATCAATGTAGCCC
C10-400    TACCATTATAGGACGCTGGCAGAATTGTATTATCATCATGTGTCAGGATCAATGTAGCCC
          ****
C9-400      TCTATATT-CTAGTGCTAAGTTCAGACAATATATGAGTAGTGCTGTACGCCAGACTCCA
C10-400    TCTATATTTCTAGTGCTATGTACAGACAAAATATGTGTACTGCGGTACGCCAGACTCCA
          ****
C9-400      CAGAGCAGGACCGTTAGCTGTGAAGAGACGCACACGGGTAATACGAGCAGCCTGTCTGCG
C10-400    CAGTGCATGGACCGTGTAGCAGTGGAGAGATGGCACACAGGAATACGATCATGCCACACA
          *** * * * *
C9-400      GCTNC-----
C10-400    GTTTTATCAGTGACTTTTGGCCTACGTCTGCCGGTGAT
          * *

```

Figura 10. Alinhamento entre as sequências obtidas com os iniciadores Gp3 (senso) e Gp4 (anti-senso). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

GP3      GGTGTGGTTTTGGAAATGTATCGTAATTAATTGATTTGATGGGATTTGGAAAGTATC
GP4      -----

GP3      CTTGTTTTCATAGGCTGTAGAAGGTTGTGGGTTTGGAAATGTATCCTAATTAATTTGAT
GP4      -----ANCAT
                                         **

GP3      TTGATTTGGGTTTTGGAAAGTATCCTTGTTTTTCATAGGGTTTGAGAATGTATCTTGGTTTT
GP4      TAAATCGATGGGTATGGAAGTTCCTTGTTTTTCATAGGGTTTGAGAATGTATCTTGGTTTT
*  *  *      *      *      *****

GP3      GATAGAGTTTGAAAAAGTATCTTATTTGATGGTGTGAGGGAATGTATCCTGTTTTGA
GP4      GATAGAGTTTGAAAAAGTATCTTATTTGATGGTGTGAGGGAATGTATCCTGTTTTGA
*****

GP3      TGGGGTTTGGAAATATATCTGATTAATGAGAGGATGNNC-----
GP4      TGGGGTTTGGAAATCTATCTTGATTTAATGGGGTTAGGGAATGTATCCTGTTTTAATC
*****      * *      * *  * *

GP3      -----
GP4      GAGTTTGGACCCAATCCAGTTTTTTGGGTTTGGGGATGTCTCCCTTTTTTGATGGGATT

GP3      -----
GP4      TGGAAATGTGACATTGCGTTAACCAGTTTCAAGCCTCATGCTTGTTCATTATTGAA

GP3      -----
GP4      ATGTGCGATTGTCATTTTAATCGAGTTTGGACGCC

```

Figura 11. Alinhamento entre a sequência obtida com o iniciador C9 (senso), correspondente ao produto de ~200 pb, e a sequência de maior similaridade com esta segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo OsHV-1 (KF517186.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

C9-200          GAGGGAAATTTGCGAGAGAAGGACAGAATGGAATGGGAGTGTGTGGTCGAAAAATACCTGCA
KF517186.1    -----

C9-200          GAATTACAATGCCTGAAAGATAGTGTAGGTAATGCGCTTTTTGAGCTGGATTGGCATAT
KF517186.1    -----

C9-200          ACCATCATTATCCCAAGATGAATGATTTGAGATTAATGAAGTACTGAGTAGCTCGAAA
KF517186.1    -----

C9-200          TGGAGACAAAACGTCGTAGTTTCCCGATTTAGTTTTTTTTGAAGGTATGAGTAATCACAG
KF517186.1    -----

C9-200          ACATAATAAAGGATTTTCATCTCGTCGAGGGATGTTCCGAGAGAAGAGATTATAACAATA
KF517186.1    -----CGAGGAAATTTGCGAGAGAAGAGATTATAACAATA
                    *****  ***  *****
C9-200          TATTTCTAGAAATGTTCTGGCGTGGAGGAATCAGGAACAGAATCAAGTACATCAAAACCA
KF517186.1    TAGTTTTAGAAATGTTATGGCGTGGAGGAATCAGGAACAGAATCAATACATCAAAACCA
                    ** * *****  *****
C9-200          TTGTCCCTG-AGATTATTAGCAGTGATCTGCCGGTGCCTCATGAAGATAGAGAGGCCGTA
KF517186.1    CTTTTCTATGATTATTAGCAGTGATCTTAGCCGGT-----
                    * * * *****  *
C9-200          TTTTGANT
KF517186.1    -----

```

Figura 12. Alinhamento entre a sequência obtida com o iniciador C10 (anti-senso), correspondente ao produto de ~200 pb, e a sequência de maior similaridade com esta segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo OsHV-1 (KF517186.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

C10-200        ATCACCGGCAGACGTAGGTACAGAAAGGTAGCCATGTCGGCATAATCCACATCCAATCCCA
KF517186.1    -----

C10-200        GACGGTAAACGCCCAGACCTGTTTCGTATCTTCAAGAGGCCAAGCAAGAAGATCATGCT
KF517186.1    -----

C10-200        AAACAGGAGATTGAGCATCTTTATTGAGCATGAATGAGACACTATTCGGTACATTATAAT
KF517186.1    -----

C10-200        TGTGGCATCAGGGGCTGAGGAGATGAGATCCAATATTATGTCAGTGAGGCAATGCCCTTA
KF517186.1    -----

C10-200        TAAGAAAATAACTCGGCAGTGTATTATCFCGGCAGTCGTAGGAAACATTATCGTTTTAT
KF517186.1    -----ATCACCGGCAGACGTAGGAAACATTATCGTTTTAT
                    *** *****  *****
C10-200        CCACCACGATTTTA-TCTCAATCATGAAACACCGCTAAGATCATGTCTAATAATCATAG
KF517186.1    CCACCACGATTTTATTATCACTCATGAAACACCGCTAAGATCACTGCTAATAATCATAG
                    ***** * ** *****
C10-200        GAAAAGTGGGTTGAGTAATGAATTCGCCATGAT----CCTCCAGCCAGTACATCTA-
KF517186.1    GAAAAGTGGGTTGATGTAATGAATTCGTCTCTGATTCCTCCACGCCATAACATCTA
                    ***** * * * *****  ***
C10-200        AAACATCCGTTT
KF517186.1    AAACAT-----
                    *****

```

Figura 13. Alinhamento entre a sequência obtida com o iniciador C9 (senso), correspondente ao produto de ~400 pb, e a sequência de maior similaridade com esta segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo *Crassostrea gigas* (XM_011450693.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

C9-400          GAGGGAAATTTGCGAGAGAAAGGTTTTAGAATGCAGGACTCGGCATGGATGTAATGTTCT
XM_011450693.1 -----GAGAGAAGGATTTAGATTTCCAGATTCAGACATGGACACTATGATCT
                    ***** * * * * *
C9-400          GGCCAATAACCCAAAGTGATCTGGGATTTCTCTCAGGCTCAGTTGTACGACACACACA
XM_011450693.1 GGTCAACTAACATTCGAGTGATCTGGGATTTCTCTCAGCTGAGTTTACAAACACACACA
                    ** * * * * *
C9-400          GACA-TTCCCTGATTCTCAGTGACAGTTCAGACAGTCCGCCAGGTTTACATTAATGTTGTT
XM_011450693.1 GACAGTACTGATTTCTCTGTGACAGTTCAGAGATCCAGCAGGATTTACGTTACTTTGGT
                    **** * *****
C9-400          TACCATTAGAGGACGCTGGCAGAAATTGTATTATCATCATGTGTGTCAGGATCAATGTAGCCC
XM_011450693.1 TACCATTGGAAAGAGCTGGACGGTTAGTGTTGTCTCATGTGTGTCAGGATGAATGGGGGAC
                    ***** * * * * *
C9-400          TCTATATTCCTAGTGCTAAGTTTCCAGACAATATATGAGTAGTGCTGTACGACCAGACTCCAC
XM_011450693.1 TCTATATATCAAGTTCATAATACAGA-----
                    ***** * * *
C9-400          AGAGCAGGACCGTTAGCTGTGAAGAGACGCACCGGTAATACGAGCAGCTGTCTGCGG
XM_011450693.1 -----
C9-400          CTNC
XM_011450693.1 ----

```

Figura 14. Alinhamento entre a sequência obtida com o iniciador C10 (anti-senso), correspondente ao produto de ~400 pb, e a sequência de maior similaridade com esta segundo buscas realizadas via BLASTn, a qual correspondeu ao organismo *Crassostrea gigas* (XM_011414440.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando-se a ferramenta Clustal Omega. * significa que as sequências são idênticas na dada posição.

```

C10-400         ATCACCGGCAGACGTAGGCCAAAAGTCACTGATAAAAAGTGTGGGCATGATCGTATTCTCTG
XM_011414440.1 ----CGGCAGAGGGAGGCCAAAATCACTGACAAAACAATAAGCATTTATCGTATTCTAG
                    ***** * * * * *
C10-400         TGTGCCATCTCTCCACTGCTACACGGTCCATGCATGTGGAGTCTGGTCTGACCGAGT
XM_011414440.1 TGGACCATTGTTCCACTGCTACATGGTCCATGTACTCTACTATCAGGAGTGATTGTTGT
                    ** * * * * *
C10-400         ACACATATTTTGTCTGTACATAGCACTAGAAATATAGAGGGCTCCATTGATCCTGACACA
XM_011414440.1 ACATGTGTGGTCTCTGTATTTAGAAGTTCATAGATAGAGTCTCCATTATCATCTCACACA
                    *** * * * * *
C10-400         TGATGATAATACAATTCTGCCAGCGTCCATAAATGGTAACCATAGTAATGTAATACCTGG
XM_011414440.1 CGATGACAAACATATATTGTCAGCTCTTCTAATGTAACAGAGTAAAGTAATCCTGC
                    ***** * * * * *
C10-400         CGGACTGTTTGAACGTGCTACTGAGAATCAGGAATGTCTGTGTGTGTCGTACAAGTGCAGC
XM_011414440.1 TGGACTCTCAGAACTGTCACAGAGAATCAGTCTGTCTGTGTATGTTGTAATATTCCAG
                    ***** * * * * *
C10-400         GCGAGAGAAATCCAGATCACC CGCGTTACTGGCCCGAACA TACTACAGGCCTAGAT
XM_011414440.1 CTGAGAGAAAGTCCAGATCCTCG-----
                    ***** * * * * *
C10-400         CAGGTAAC
XM_011414440.1 -----

```


ANEXO C

Tabela 1. Dois melhores resultados de alinhamento obtidos com o BLASTn para as amostras sequenciadas.

Iniciador	Sequência homóloga	Identidade (%)	E-value	Código de acesso
VSPN-F	<i>Vibrio splendidus</i> strain ATCC 33125 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	78	6E-24	AF413024.1
	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1	92	2E-08	FM954972.2
VSPN-R	<i>Vibrio splendidus</i> strain ATCC 33125 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	79	7E-24	AF413021.1
	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1	78	2E-19	FM954972.2
VTS	<i>Vibrio splendidus</i> strain 636 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	0.0	AY620972.1
	<i>Vibrio splendidus</i> partial 16S rRNA gene, strain 01/108	99	0.0	AJ874361.1
C9-200	Ostreid herpesvirus 1 isolate 002-ORF5b genomic sequence	90	2E-39	KF517186.1
	Ostreid herpesvirus 1 isolate 001-ORF5b genomic sequence	90	2E-39	KF517185.1
C10-200	Ostreid herpesvirus 1 isolate 002-ORF5b genomic sequence	91	1E-48	KF517186.1
	Ostreid herpesvirus 1 isolate 001-ORF5b genomic sequence	90	5E-47	KF517185.1
C9-400	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> uncharacterized LOC105343365 (LOC105343365), mRNA	77	2E-45	XM_011450693.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> uncharacterized LOC105347765 (LOC105347765), mRNA	77	4E-42	XM_011456966.1
C10-400	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> uncharacterized LOC105317707 (LOC105317707), mRNA	74	4E-48	XM_011414440.1
	PREDICTED: <i>Crassostrea gigas</i> uncharacterized LOC105343365 (LOC105343365), mRNA	74	5E-47	XM_011450693.1
GP3/GP4	No significant matches.			

ANEXO D

Prevenção

- ✓ Não adquirir sementes sem o Atestado Sanitário e GTA;
- ✓ Os animais devem ser comercializados assim que atingirem tamanho comercial, para permanecer o menor tempo possível na água;
- ✓ Utilizar densidade de cultivo adequada;
- ✓ Evitar o transporte de ostras adultas entre diferentes locais sem o estudo prévio da carga parasitária;
- ✓ Monitorar a ocorrência de enfermidades (observar o aspecto e coloração do corpo mole da ostra) e de mortalidades.

O que fazer em caso de ocorrência de mortalidade?

Caso haja sinais de enfermidade ou ocorrência de mortalidades significativas, o produtor deverá comunicar a CIDASC, a qual é responsável pelas ações voltadas em defesa da sanidade agropecuária de Santa Catarina.



0800- 643 9300

REALIZAÇÃO:



APOIO:



Ministério da Pesca e Aquicultura



AGRADECIMENTOS:

Agradecemos a todos ostreicultores que contribuíram para a realização deste projeto.



MONITORAMENTO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM OSTRAS CULTIVADAS EM SANTA CATARINA

Este informativo visa divulgar aos produtores quais parasitas (microscópicos) foram encontrados em ostras cultivadas em Santa Catarina, a partir de um estudo realizado durante o período de janeiro de 2013 a agosto de 2014.

A ideia principal deste projeto foi fazer uma verificação da presença de alguns dos principais organismos causadores de doenças que podem causar mortalidades em ostras cultivadas.

Os locais monitorados foram: Balneário Barra do Sul, Biguaçu, Florianópolis, (Baía Sul e Baía Norte) e Palhoça.

Protozoário

Nome científico:
Perkinsus belhaiensis



O que causa?

Podem causar mortalidades pequenas ou massivas, mas muitas ostras podem sobreviver até três anos infectadas.

Sinais: corpo mole da ostra com coloração pálida, gônada reduzida, diminuição do crescimento, encolhimento do manto e podem desenvolver bolsas de pus.

Não transmissível ao ser humano.

Onde foi encontrado?

Ceará: *Crassostrea gigas* (ostra japonesa), *C. Rhizophorae* (ostra nativa), *Anomalocardia brasiliiana* (berbigão)

Paraíba: *C. rhizophorae* e *C. gasar* (ostras nativas)

Santa Catarina: *C. gasar* (ostra nativa)

Herpes Virus

Nome científico:
Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)



O que causa?

Pode infectar ostras de todas as idades, mas principalmente larvas e juvenis. Na Europa, este vírus já causou mortalidades de até 100 % de ostras, principalmente no verão, quando ele é mais ativo.

Sinais: nas larvas de ostras, causa lesões no manto e problemas de nado, fazendo com que elas se depositem no fundo. Nos adultos não causa alterações visíveis.

Não transmissível ao ser humano.

Onde foi encontrado?

Santa Catarina: *C. gigas* (ostra japonesa) e *C. gasar* (ostra nativa)

Vibrio

Nome científico:
Vibrio splendidus



O que causa?

Vibrios são bactérias que podem afetar vários animais marinhos. Existem muitas espécies de vibrio e algumas delas causam doenças nas ostras. A espécie *V. splendidus* já foi associada a mortalidades massivas de ostras na Europa e também fica mais ativo no verão.

Sinais: não apresentam sinais visíveis a olho nu.

Pode causar sintomas em humanos que ingerirem ostras com uma elevada carga bacteriana. Pode ocorrer náusea, vômito, cólica abdominal e calafrio.

Onde foi encontrado?

Santa Catarina: *C. gigas* (ostra japonesa) e *C. gasar* (ostra nativa)

ANEXO E

ATIVIDADES ACADÊMICAS E PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

Realização de doutorado sanduíche

Março, 2013 – Fevereiro, 2014

Supervisora: Dra. Caroline Montagnani

Laboratório: *Mécanismes d'Interaction et d'Adaptation en Milieu Marin*

Universidade de Montpellier II, França

Título do Projeto: **Caracterização da resposta antiviral em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* por abordagem proteômica**

Bolsa: CAPES/PDSE

OBS: Os resultados relacionados ao doutorado sanduíche não foram apresentados nesta tese, uma vez que os experimentos ainda estão em andamento, a fim de complementar os dados obtidos até então para posterior publicação.

Participação em eventos e apresentação de trabalhos

2012 **I Simpósio de Integração das Pós-graduações do CCB** – Florianópolis/SC.

Comissão organizadora

2012 **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** – Porto de Galinhas/PE.

Apresentação oral: Microalga nociva e ficotoxinas modulam a expressão de genes associados a sistemas de defesa em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas*.

2013 **17th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms** – Faro, Portugal.

Apresentação oral: Antioxidant system and immunocompetence of pacific oyster hemocytes under a xenobiotic challenge.

- 2014 **XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** – Guarapari/ES.
Apresentação de poster: Efeito da hipóxia sobre hemócitos de mexilhões *Perna perna*.
- 2015 **SETAC Latin America 11th Biennial Meeting** – Buenos Aires, Argentina.
Apresentação de poster: Effects of glutathione depletion in a marine bivalve.

Publicação de artigos

Relacionados ao doutorado:

MELLO, D. F.; ARL, M.; TREVISAN, R.; DAFRE, A. L. How important are glutathione and thiol reductases to oyster hemocyte function? **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, p. 566-572, **2015**.

MELLO, D. F.; DANIELLI, N. M.; CURBANI, F.; PONTINHA, V. A.; SUHNEL, S.; CASTRO, M. A. M.; MEDEIROS, S. C.; WENDT, N. C.; TREVISAN, R.; MAGALHÃES, A. R. M. & DAFRE, A. L. First evidence of *Vibrio splendidus* and ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infecting *Crassostrea gigas* and *C. gasar* oysters from the Brazilian coast. **Journal of Invertebrate Pathology**, **2016** (submitted).

MELLO, D. F.; TREVISAN, R.; DANIELLI, N. M. & DAFRE, A. L. Effects of glutathione depletion in oyster immunocompetence and survival upon oxidative and bacterial challenges. In preparation: to be submitted to **Fish and Shellfish Immunology**.

Outros:

TREVISAN, R.; MELLO, D. F.; DELAPEDRA, G.; SILVA, D. G. H.; ARL, M.; DANIELLI, N. M.; METIAN, M.; ALMEIDA, E. A.; DAFRE, A. L. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. **Aquatic Toxicology**, **2016** (in press).

TREVISAN, R.; DELAPEDRA, G.; MELLO, D. F.; ARL, M.; SCHMIDT, E. C.; MEDER, F.; MONOPOLI, M.; CARGNIN-FERREIRA, E.; BOUZON, Z. L.; FISHER, A. S.; SHEEHAN, D.;

DAFRE, A. L. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 153, p. 27-38, **2014**.

TREVISAN, R.; MELLO, D. F.; ULIANO-SILVA, M.; DELAPEDRA, G.; ARL, M.; DAFRE, A. L. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Marine Environmental Research**, v. 101, p. 81-90, **2014**.

SIMÕES, E.; VIEIRA, R. C.; SCHRAMM, M. A.; MELLO, D. F.; PONTINHA, V. A.; DA SILVA, P. M.; BARRACCO, M. A. Impact of harmful algal blooms (*Dinophysis acuminata*) on the immune system of oysters and mussels from Santa Catarina, Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the UK(Online)**, v. 1, p. 1-9, **2014**.

MELLO, D. F.; DA SILVA, P. M.; BARRACCO, M. A.; SOUDANT, P.; HÉGARET, H. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. **Harmful Algae**, v. 26, p. 45-51, **2013**.

MELLO, D. F.; DE OLIVEIRA, E. S.; VIEIRA, R. C. ; SIMOES, E.; TREVISAN, R.; DAFRE, A. L.; BARRACCO, M. A. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in vitro* to brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, p. 583-597, **2012**.

TREVISAN, R.; ARL, M.; SACCHET, C. L.; ENGEL, C. S.; DANIELLI, N. M.; MELLO D. F.; BROCARDI, C.; MARIS, A. F.; DAFRE, A. L. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 108, p. 85-93, **2012**.