



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

IMPACTO DA FLORAÇÃO DA ALGA NOCIVA *Dinophysis acuminata* SOBRE O SISTEMA IMUNE DE OSTRAS *Crassostrea gigas* E MEXILHÕES *Perna perna* CULTIVADOS EM SANTA CATARINA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura

Orientadora: Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barraco

Co-orientadora: Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

Erik Simões

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S593i Simões, Erik

Impacto da floração da alga nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões Perna perna cultivados em Santa Catarina [dissertação] / Erik Simões ; orientador, Margherita Anna Barracco. - Florianópolis, SC, 2011.

84 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Algas. 3. Bivalve - Criação - Santa Catarina. 4. Imunohematologia. I. Barracco, Margherita Anna Antonia Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

Impacto da floração da alga nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna perna* cultivados em Santa Catarina

Por

ERIK SIMÕES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barraco – *Orientadora*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dr. Mathias Alberto Schramm

Aos meus pais, Solange e Chico,
dedico esse trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais que sempre me deram todo suporte e incentivo para que eu pudesse chegar aqui. Não existem palavras que demonstrem minha imensa gratidão e amor que sinto por vocês. A Lú, minha esposa, e Thi, meu irmão, que conviveram comigo durante esse período, amo muito vocês.

Agradeço também a todos os professores do Departamento de Aquicultura pelos conhecimentos e experiências transmitidos desde o curso de graduação.

Muitíssimo obrigado a todos os integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura pelo diário e excelente convívio nas atividades do “lab” e pelos ensinamentos prestados: Miriam, Paulinha, Liege, Gabi, Tailin, Cris, Pri, Pedro, Scheila, Douglas e um especial à Eliza, Renato e Dani que trabalharam efetivamente nesse projeto. Meus agradecimentos também à professora Dra. Luciane Perazzolo pelo convívio e ensinamentos nesse período de trabalho.

À professora Dra. Margherita Anna Barracco pela orientação e amizade nesse período do projeto. Sua dedicação ao trabalho e amor pela profissão trazem a admiração de todos que tiveram a felicidade de trabalhar com você. E também por sua luta e dedicação para colocar o nome do naturalista Fritz Müller, o *Príncipe das Observações*, no topo da ciência catarinense e mundial.

À professora Dra. Patrícia Mirella pela coorientação nesse presente projeto, seus ensinamentos e exímio domínio das práticas laboratoriais foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Ao amigo Msc. Vitor Pontinha do NEPAQ – Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, pelo auxílio nas análises histológicas.

Obrigado ao Laboratório de Camarões Marinhos, em nome do professor Dr. Roberto Bianchini Derner, que nos forneceu os nutrientes e cepas para o cultivo de microalgas durante alguns ensaios experimentais.

Um agradecimento a toda equipe do Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas da UNIVALI: Thiago, Márcio, Renata, Maria Cecília e Thatiana pelo belíssimo trabalho realizado e ensinamentos prestados e um agradecimento especial aos professores Dr. Luís Antônio de Oliveira Proença e Dr. Mathias Alberto Schramm que aceitaram a parceria e contribuíram tanto para a realização desse projeto.

Agradeço também a todos os produtores que nos auxiliaram nas coletas e no fornecimento dos animais para esse experimento. Agradeço muito aos técnicos Jalmor e Ismael que sempre ajudaram no transporte e provimento de água do mar para nosso laboratório, indispensável para nossas atividades.

Um agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento desse presente projeto.

RESUMO

Florações da microalga nociva *Dinophysis acuminata* vêm se tornando recorrentes na costa de Santa Catarina. No presente estudo avaliou-se a modulação de alguns parâmetros imunológicos em ostras *C. gigas* e mexilhões *P. perna* cultivados, durante florações naturais de *D. acuminata* que produzem toxinas diarréicas (ácido ocadáico e compostos relacionados). Os bivalves foram coletados durante duas florações, uma na Praia Alegre (PA: 2.950 algas/L) no município de Penha/SC e outra na Praia de Zimbros (PZ: 4.150 algas/L) no município de Bombinhas/SC e 30 dias após o término das florações (grupo referencia). Na PA foram coletados apenas mexilhões. Os parâmetros analisados a partir da hemolinfa foram: os hemogramas ou contagem total (THC) e diferencial de hemócitos (DHC), o índice de hemócitos apoptóticos (IA) (coloração de Hoechst), a atividade da enzima fenoxidase ou PO (produção de DOPAcromo), a concentração de proteínas totais (CP – método de Bradford) e o título aglutinante (TA – eritrócitos de cão) da hemolinfa. Foram ainda realizadas análises histológicas convencionais com coloração HE nas ostras da PZ. Dentre os parâmetros imunológicos analisados, alguns apresentaram alterações significativas em relação aos grupos referencia. A THC dos mexilhões variou durante ambas as florações, porém de forma contrastante. Na PA houve uma diminuição do número de hemócitos (54%) e na PZ um aumento (64%) da THC. A atividade da PO aumentou (50%) nos mexilhões da PA e declinou (40%) nas ostras da PZ. A CP aumentou (66%) apenas nos mexilhões da PZ. Os outros parâmetros imunológicos não se alteraram em relação às florações em ambos bivalves. Não foram observados danos teciduais nas ostras analisadas. Os resultados obtidos não mostraram um comportamento uniforme da modulação dos parâmetros imunológicos em relação às florações de *D. acuminata*. Contudo, ficou evidente que alguns parâmetros são de fato afetados durante as florações em ambos bivalves, em especial nos mexilhões que parecem ser os mais sensíveis e que acumulam uma maior concentração de ácido ocadáico (10 vezes superior) em seus tecidos. Estas alterações poderiam tornar estes animais menos resistentes e mais propensos a contrair infecções, impactando desta forma seu cultivo.

Palavras-chave: Algas nocivas, bivalves cultivados, parâmetros hemato-imunológicos, histopatologia, hemolinfa.

ABSTRACT

Blooms of the harmful microalgae *Dinophysis acuminata* are becoming recurrent in the coast of Santa Catarina. In this study we evaluated the modulation of some immunological parameters in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Perna perna*) during natural blooms of the dinoflagellate *D. acuminata* that produces diarrhetic toxins (okadaic acid and related compounds). The bivalves were collected during two distinct blooms, one in Praia Alegre (PA: 2.950 algas L⁻¹) and on the other in Praia de Zimbros (PZ: 4.150 algas L⁻¹). Control animals were collected at the same sites, 30 days after the end of the blooms (reference group). In PA only mussels were collected. The hemolymph parameters analyzed were: total (THC) and differential (DHC) hemocyte counts, percentage of apoptotic hemocytes (PA - Hoechst staining), phenoloxidase activity (PO - dopachrome production), total protein concentration (CP - Bradford method) and the hemagglutinating titer (TA - dog erythrocytes). Histopathological analysis were also carried out but only in oysters, using HE staining. Some of the investigated immuneparameters were in fact altered, especially in mussels, during *D. acuminata* blooms, but the results were contrasting; in PA the THC decreased (54%), whereas in PZ the number of hemocytes increased significantly (64%). On the other hand, PO activity increased (50%) in mussels from PA and declined (40%) in oysters from PZ. The CP of hemolymph increased (66%) only in mussels from PZ. The other immunological parameters did not change during the microalgal blooms compared to the reference groups in both bivalves. No tissue damage was observed in oysters from PZ. The results obtained in this study did not produce a uniform and consistent variation pattern of the immuneparameters of both bivalves, upon exposure to *D. acuminata* blooms. However, it was evident that some parameters were indeed affected during the microalgal blooms especially in mussels that appear to be more sensitive and that accumulate more okadaic acid (10 times greater) in their tissues. These effects may result in a decreased immune resistance of the animals, making them more susceptible to infections, and thus put at risk their cultivation.

Key words: Harmful Algae, cultivated bivalves, hemato-immunological parameters, histopathology, hemolymph.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Micrografia eletrônica do dinoflagelado *Dinophysis acuminata*..... 28
- Figura 2** – Micrografia do dinoflagelado *Dinophysis acuminata* realizando extração citoplasmática do ciliado *Myrionecta rubra* através do pedúnculo..... 29
- Figura 3** – Estrutura química do ácido ocadáico e seus derivados 29
- Figura 4** – Sítios de coleta de mexilhões e ostras em fazendas marinhas durante os episódios de florações de *D. acuminata*. Barra: 20 km..... 45
- Figura 5** – Micrografias mostrando diferentes tecidos de ostras coletadas na Praia de Zimbros (PZ) durante uma floração por *D. acuminata* (a, c, e, g) e 30 dias após o seu término (b, d, f, h). Coloração HE. Estão representadas a borda do manto (a, b); as brânquias (c, d); os túbulos digestivos (descamação indicada pela seta) (e, f); o intestino com infiltração de hemócitos indicada pelas setas (g) e estômago (h). Barra: 100 μm 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação e limites das ficotoxinas segundo o comitê FAO/WHO/IOC	25
Tabela 2 – Parâmetros abióticos nos sítios de coleta	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- AD** – Ácido domóico
AO – Ácido ocadáico
ASP – *Amnesic shellfish poisoning* (síndrome amnésica)
AZA – Azaspirácidos
CP – Concentração de proteínas totais
DHC – *Differential hemocyte counts* (contagem diferencial de hemócitos)
DSP – *Diarrhoeic shellfish poisoning* (síndrome diarréica)
dsRNA – double-stranded RNA (RNA dupla fita)
DTX – Dinophysistoxinas
EDTA – Ácido diamino tetracético
FANs – Florações de algas nocivas
HT – Hemolinfa total
IA – Índice apoptótico
LPS – Lipopolissacarídeos
MCF – Microscópio de contraste de fase
NSP – *Neurotoxic shellfish poisoning* (síndrome neurotóxica)
OD – Oxigênio dissolvido
PA – Praia Alegre
PAMs – Peptídeos antimicrobianos
PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns* (padrões moleculares associados a patógenos)
PGNs – Peptidoglicanas
PO – Fenoloxidase
proPO – Pró-fenoloxidase
PRPs– *Pattern recognition proteins* (proteínas de reconhecimento padrão)
PRR – *Pattern recognition receptors* (receptores de reconhecimento padrão)
PSP – *Paralytic shellfish poisoning* (síndrome paralisante)
PZ – Praia de Zimbros
RNI – *Reactive nitrogen intermediates* (reativos intermediários de nitrogênio)
ROI – *Reactive oxygen intermediates* (reativos intermediários de oxigênio)
STX – Saxitoxina
TA – Título aglutinante
THC – *Total hemocyte counts* (contagem total de hemócitos)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
AQUICULTURA E O CULTIVO DE MOLUSCOS	21
FLORAÇÕES DE ALGAS NOCIVAS (FAN) E SEU IMPACTO NA MALACOCULTURA.....	23
A MICROALGA TÓXICA <i>Dinophysis acuminata</i>	27
SISTEMA IMUNE DE MOLUSCOS BIVALVES	30
JUSTIFICATIVA	37
OBJETIVOS	39
OBJETIVO GERAL	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
ARTIGO CIENTÍFICO: Impacto da floração da alga nociva <i>Dinophysis acuminata</i> sobre o sistema imune de ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) e mexilhões (<i>Perna perna</i>) cultivados em Santa Catarina	41
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 COLETA DE ANIMAIS E EXTRAÇÃO DE HEMOLINFA	41
2.2 DETERMINAÇÕES DO NÚMERO DE MICROALGAS E DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADÁICO (AO) NOS TECIDOS DOS BIVALVES	46
2.3 PROCESSAMENTO DA HEMOLINFA	46
2.4 DETERMINAÇÃO DOS HEMOGRAMAS	47
2.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE APOPTÓTICO (IA)	47
2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (CP) NA HEMOLINFA.....	47
2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE (PO).....	47
2.8 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO AGLUTINANTE DA HEMOLINFA (TA)	48
2.9 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	48
2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48

3 RESULTADOS	49
3.1 PARÂMETROS ABIÓTICOS	49
3.2 CONCENTRAÇÃO DE <i>D. acuminata</i> NA ÁGUA E DE ÁCIDO OCADÁICO (AO) NA GLÂNDULA DIGESTIVA DOS BIVALVES.....	49
3.3 HEMOGRAMAS.....	50
3.4 PORCENTAGEM DE HEMÓCITOS APOPTÓTICOS	50
3.5 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (CP).....	50
3.6 ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE (PO)	50
3.7 TÍTULO AGLUTINANTE (TA).....	52
3.8 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	52
4 DISCUSSÃO	55
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	67

INTRODUÇÃO

AQUICULTURA E O CULTIVO DE MOLUSCOS

O constante crescimento da população mundial tem resultado proporcionalmente na necessidade do aumento da produção alimentícia incluindo as fontes de proteína de origem animal. Não é apenas a quantidade dessa proteína animal produzida que tem sido objeto de preocupação mundial, mas também a qualidade desses produtos principalmente no que tange à saúde pessoal, sendo o pescado considerado por nutricionistas, os maiores aliados a uma alimentação saudável. Com a estagnação da exploração dos estoques pesqueiros nos últimos anos (FAO, 2010a) a aquicultura tem se tornado a principal via de produção de pescado, com as taxas de crescimento do setor superando as tradicionais atividades pecuárias como bovinocultura e avicultura (FAO, 2009, 2010b). A aquicultura mundial representa quase 38% da produção de pescado sendo o restante proveniente do extrativismo (FAO, 2010a). Esta atividade teve um crescimento de 3,5 % ao ano em média de 2000 a 2009 enquanto no mesmo período a pesca extrativista obteve um decréscimo de quase 0,6 % (FAO, 2007, 2010a). Segundo levantamento divulgado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010), entre os anos de 2000 e 2009, a aquicultura nacional teve um crescimento de quase 44 %. Em 2009, a produção nacional de pescado oriundo da aquicultura foi de cerca de 415 mil toneladas, sendo que 70 % provinha de águas continentais e 30 % de águas marinhas ou salobras (maricultura) (MPA, 2010).

Dentre as diversas atividades da maricultura, destaca-se o cultivo de moluscos ou malacocultura, mais especificamente o cultivo de bivalves, como ostras (ostreicultura), mexilhões (mitilicultura) e vieiras (pectinicultura). A produção de moluscos bivalves no Brasil teve início na década de 70 com tentativas de cultivo das ostras de mangue classificadas como *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* nos Estados da Bahia e Santa Catarina e do mexilhão *Perna perna* no Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (FERREIRA e NETO, 2006). Segundo esses mesmos autores, essa mesma década foi marcada pela entrada da ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) importada da Inglaterra, quando foram realizados os primeiros cultivos experimentais no Estado do Rio de Janeiro, porém sem sucesso econômico.

Na década de 80, se iniciaram os primeiros projetos de pesquisa visando o cultivo de ostras e mexilhões no Estado de Santa Catarina realizados pelo Departamento de Aquicultura da Universidade Federal

de Santa Catarina (UFSC) (POLI, 1998). Posteriormente, na década de 90, com a criação do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) e o fornecimento programado de suas sementes, juntamente com as novas tecnologias e infra-estruturas desenvolvidas para a atividade, o cultivo de moluscos bivalves teve um crescimento e expansão importantes no Brasil, principalmente no Estado de Santa Catarina, que hoje representa o maior produtor de bivalves de cultivo a nível nacional. Este estado contribui com mais de 90 % da produção nacional de moluscos marinhos cultivados, sendo que em 2009, comercializou cerca de 8.000 t de ostras e 13.000 t de mexilhões (EPAGRI/CEDAP, 2009).

A ostra japonesa *Crassostrea gigas*, também conhecida como ostra do Pacífico, teve o início de seu cultivo em seu país de origem (Japão), sem data precisa, porém com relatos seculares de sua atividade (HELM, 2005). Apenas no início do século XX essa espécie foi introduzida em outros países, como na década de 20 nos Estados Unidos (LAVOIE, 2005) e na década de 60 na Europa (BUESTEL et al., 2009). Essa espécie teve uma excelente adaptação em muitos países tornando-se hoje a espécie mais cultivada a nível mundial, com uma produção anual de 650 mil t (FAO, 2010b). Entre os anos de 1999 e 2008, os maiores produtores mundiais dessa espécie foram a China, Japão, Coréia do Sul e França (FAO, 2010b). Cabe ressaltar que a ostra *C. gigas* teve uma excelente adaptação em mares brasileiros, mais especificamente no Estado de Santa Catarina, cujas condições climáticas e oceanográficas permitem um ciclo de cultivo com duração de 7 a 9 meses.

O cultivo de mexilhões também é bem distribuído a nível mundial, porém, diferentemente da ostreicultura que possui uma espécie predominante, a mitilicultura trabalha basicamente com as espécies nativas de cada país produtor. Entre os maiores produtores de mitilídeos no mundo estão a China, com uma produção de 480 mil t de diversas espécies da família *Mytilidae*, a Tailândia com 240 mil t da espécie *Perna viridis*, a Espanha com 180 mil t principalmente das espécies *Mytilus edulis* e *M. galloprovincialis* e a Nova Zelândia com 100 mil t da espécie *Perna canaliculus*, (FAO, 2010b). No Brasil, a espécie nativa *Perna perna*, responde por toda produção nacional de mexilhões oriundos de cultivos, sendo Santa Catarina o principal Estado produtor, responsável por mais de 90 % da produção nacional com pouco mais de 12 mil t produzidas em 2009 (EPAGRI/CEDAP, 2009).

Assim como qualquer outra atividade agropecuária, a ostreicultura e a mitilicultura estão sujeitas a enfermidades e patologias provocadas por diferentes microrganismos e parasitas que podem comprometer e limitar seus cultivos (LAUCKNER, 1983). Além das

enfermidades, a malacocultura enfrenta ainda o embargo de seus produtos quando suas áreas de cultivo são afetadas por uma rápida multiplicação de microalgas produtoras de toxinas, fenômeno conhecido como florações de algas nocivas (FANs).

FLORAÇÕES DE ALGAS NOCIVAS (FAN) E SEU IMPACTO NA MALACOCULTURA

As FANs são um fenômeno mundialmente conhecido por seu forte impacto ecológico e econômico nas regiões costeiras onde ocorrem (SVENSSON, 2003; DYSON e HUPPERT, 2010). Sua ocorrência vem aumentando em frequência, intensidade e distribuição geográfica (HALLEGRAEFF et al., 2003). Os motivos do crescimento desses eventos parecem estar relacionados com o aumento da eutrofização das regiões costeiras (ANDERSON; GLIBERT; BURKHOLDER, 2002), a contaminação marinha por água de lastro de navios (BOLCH e DE SALAS, 2007; BUTRON; ORIVE; MADARIAGA, 2011), a transferência de estoques pesqueiros entre diferentes áreas (HEGARET et al., 2008) e mais recentemente às alterações climáticas em função do aquecimento global (HALLEGRAEFF, 2010; PAERL; HALL; CALANDRINO, 2011). O aumento do número de observações de FANs também pode ser atribuído ao crescente número de áreas de cultivos e consequente aumento de programas de monitoramento de algas nocivas.

As florações de microalgas são fenômenos naturais que podem ocorrer tanto em águas interiores quanto em costas litorâneas e mar aberto (oceânica). Não são apenas as espécies produtoras de toxinas que oferecem riscos ao ambiente e aos cultivos de organismos aquáticos. As espécies não-tóxicas também podem formar florações capazes de acarretar momentos de anoxia nos ambientes em que proliferam sendo registradas grandes mortalidades em animais de cultivo como peixes (TREASURER; HANNAH; COX, 2003) e mexilhões (PEPERZAK e POELMAN, 2008).

Historicamente, o primeiro indício de uma floração de alga nociva, data do ano 1000 a.C. sendo relatados no antigo testamento (Êxodo, 7:20-21). Este relato descreve que a água do Rio Nilo se tingiu de vermelho, aparentando sangue, havendo uma massiva mortalidade de peixes e que a água se tornou tão fétida que os egípcios não a puderam beber. Segundo revisões de Otero (2008) e Hallegraeff (2010) os povos pré-colombianos já conheciam os perigos de consumir moluscos quando eram observadas manchas vermelhas no mar durante o dia ou luminescência durante a noite. Segundo esses autores, um dos primeiros

relatos fatais relacionados a florações de algas nocivas ocorreu em 1793 com tripulantes de uma embarcação inglesa, após ingestão de moluscos contaminados na costa do Canadá, quando na ocasião havia sido observada bioluminescência na água, episódio temido pelos indígenas locais. Mais recentemente, em 1927, foram notificadas 102 vítimas de intoxicação após ingestão de mexilhões contaminados por ficotoxinas nos Estados Unidos (KAO, 1966) e em 1976 houve intoxicações similares na Holanda, Japão e Espanha (OTERO, 2008). Em 1981, assumiu especial destaque um surto de intoxicação na Espanha, após consumo de mexilhões contaminados por ficotoxinas, que atingiu cerca de 5.000 pessoas. Também na América do Sul já foram registrados episódios de intoxicação, após a ingestão de mexilhões contaminados por ficotoxinas, como na Argentina em 2002 (GAYOSO e FULCO, 2006).

No Brasil, poucos são os relatos de intoxicações em humanos por ficotoxinas, mas provavelmente diversos casos podem ter ocorrido, porém sem os devidos registros face à falta de conhecimento que pudessem atribuir as intoxicações às ocorrências de microalgas nocivas. Um dos primeiros relatos de casos de intoxicação humana por ficotoxinas foi descrito por Satô, Paranaguá e Eskinazi (1963) no litoral de Pernambuco, quando atribuíram a doença conhecida como “*febre de Tamandaré*” em banhistas e moradores da região, às florações da cianobactéria *Trichodesmium erythraeum*. No litoral de Santa Catarina, o primeiro relato de intoxicações em humanos, ocorreu em 1990 após o consumo de mexilhões obtidos de bancos naturais no município de Florianópolis (ZENEBO e PREGNOLATTO, 1992). Outro caso é relatado por Proença (2007) no município de Bombinhas em 2007, quando cerca de 130 pessoas apresentaram disfunções gastrointestinais em função do consumo de moluscos bivalves contaminados, visto que análises de amostras de moluscos dessa região apresentaram resultados positivos no bioensaio com camundongos para toxinas diarréicas, tanto para mexilhões quanto para ostras, além da contagem/identificação fitoplanctônica de amostras de água da região, confirmar a presença de *D. acuminata* em uma das maiores concentrações ($5,2 \times 10^4$ cél.L⁻¹) dessa microalga nociva já registrada em águas brasileiras.

As diferentes intoxicações causadas por ficotoxinas recebem seus nomes de acordo aos respectivos sintomas clínicos causados pela intoxicação, sendo classificados em: síndrome amnésica ou ASP (do inglês: *Amnesic Shellfish Poisoning*), causada principalmente pelas diatomáceas *Pseudo-nitzschia* sp; síndrome paralisante ou PSP (do inglês: *Paralytic Shellfish Poisoning*), causada especialmente pelos dinoflagelados *Gymnodinium* sp.; síndrome diarréica ou DSP (do inglês:

Diarrhoeic Shellfish Poisoning) causada principalmente pelos dinoflagelados *Dinophysis* sp. e *Prorocentrum* sp.; síndrome neurotóxica ou NSP (do inglês: *Neurotoxic Shellfish Poisoning*) causada sobretudo pelo dinoflagelado *Karenia brevis*.

Apesar dos poucos relatos oficialmente documentados de intoxicações por florações de algas nocivas em humanos no Brasil, algumas espécies potencialmente causadoras de florações já foram identificadas no litoral brasileiro como o dinoflagelado causador de PSP *Gymnodinium catenatum* no Espírito Santo (OLIVEIRA, 2005; SCHRAMM et al., 2006) e em Santa Catarina (PROENÇA; TAMANAHA; SOUZA, 2001). Algumas espécies causadoras de ASP, do gênero *Pseudo-Nitzcha* já foram identificadas nos litorais de São Paulo (MOSER et al., 2011), Paraná (MAFRA JR, 2005) e Santa Catarina (RÖRIG et al., 1998; ALVES et al., 2010). Também já foi registrada uma floração da cianobactéria *Trichodesmium erythraeum* no litoral da Bahia (PROENÇA; TAMANAHA; FONSECA, 2009).

Diante dos grandes riscos à saúde humana, o *Codex Alimentarius*, programa responsável pela padronização mundial da segurança alimentar, reuniu especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), da Organização Mundial da Saúde (WHO) e da Comissão Intergovernamental da UNESCO (IOC), para realizarem uma revisão sobre as ficotoxinas que contaminam moluscos bivalves. Esse comitê propôs uma nova classificação para as toxinas, basicamente fundamentada nas já caracterizadas estruturas químicas desses compostos. O resultado do relatório final (TOYOFUKU, 2006) aponta 8 diferentes grupos de toxinas, porém por falta de comprovações de real toxicidade em humanos, apenas 5 grupos (tabela 1) foram classificados como realmente nocivos aos consumidores de moluscos contaminados e indicam um limite aceitável da presença dessas toxinas.

Tabela 1: Classificação e limites máximos permitidos das ficotoxinas na carne de moluscos para consumo humano segundo o comitê FAO/WHO/IOC

Grupo	Síndrome	Limite*
azaspirácidos (AZA)	DSP	0,16
ácido domóico (AD)	ASP	20
ácido ocadáico (AO)	DSP	0,16
saxitoxinas (STX)	PSP	0,8
yessotoxinas	**	1

*mg da toxina/kg de carne de molusco; ** não classificado

Fonte: Toyofuku (2006)

Até o momento, o controle das florações de microalgas nocivas se restringe ao monitoramento temporal com amostras da água para identificação e contagem de espécies tóxicas e amostras de bivalves para realização de bioensaios ou análises químicas. O relatório final do comitê FAO/IOC/WHO não estabelece nenhum protocolo padrão sobre os procedimentos do monitoramento, porém indica as diretrizes que um plano deve conter (TOYOFUKU, 2006). O monitoramento pode conduzir perfeitamente a um diagnóstico momentâneo da área investigada, porém não pode evitar o aparecimento de episódios de FANs, que uma vez estabelecida, deve ser notificada e a área afetada embargada. Com o objetivo de tratar *in loco* áreas afetadas pelas FANs, alguns estudos utilizando aplicações de argila pura ou enriquecida com aditivos mostraram ser eficientes na floculação e sedimentação de microalgas nocivas (SENGCO e ANDERSON, 2004; SENGCO et al., 2005; SONG et al., 2010). Esse método poderia ser aplicado tanto como forma de prevenção como de remediação em áreas afetadas pelas florações (PAN et al., 2006; PAN; CHEN; ANDERSON, 2011). No entanto, diversos trabalhos questionam a prática da aplicação dessas substâncias, alegando variabilidade na eficiência de acordo com a dinâmica de fluxo de água no ambiente (BEAULIEU; SENGCO; ANDERSON, 2005), aumento dos custos de produção (ZOU et al., 2006) e o impacto ambiental que essa prática pode causar (SHUMWAY et al., 2003; ARCHAMBAULT et al., 2004; BEAULIEU; SENGCO; ANDERSON, 2005). A viabilidade dessa técnica para cultivos de moluscos bivalves pode ainda ser questionada pelo fato da aplicação desses materiais também promover a floculação e sedimentação das espécies de microalgas que serviriam de alimento aos animais de cultivo, comprometendo dessa forma a sua alimentação.

É interessante ressaltar que o acúmulo de toxinas pelos moluscos bivalves durante as FANs pode variar de acordo com as espécies e parece via de regra, ser maior nos mexilhões do que nas ostras (LINDEGARTH et al., 2009; KACEM, 2010) ou vieiras (REIZOPOULOU et al., 2008). Porém o mecanismo e tempo de depuração destas toxinas não são ainda conhecidos e é ainda controverso na literatura em relação aos fatores ambientais e fisiológicos (DUINKER et al., 2007).

Atualmente, por todas as partes do mundo, são relatados episódios de FANs, causando também prejuízos ao turismo, malacocultura e comércio pesqueiro local (DYSON e HUPPERT, 2010). Pescados contaminados por toxinas de microalgas oferecem um sério

risco à saúde pública, tornando necessária a implantação de programas de monitoramento de ficotoxinas nos principais países produtores.

Segundo o histórico apresentado por Schramm (2008), as providências governamentais brasileiras sobre os problemas das FANs, tiveram início em 2002 com a publicação da portaria nº 021/GABS/DAS pelo Governo do Estado de Santa Catarina através da Secretaria de Desenvolvimento Rural e da Agricultura. Nessa portaria, o Art. 13 do capítulo V ressalta a necessidade da identificação das ficotoxinas causadoras das síndromes já apresentadas. Porém apenas em 2005 foi oficialmente estabelecido um programa oficial de monitoramento de algas nocivas em Santa Catarina. O primeiro episódio brasileiro oficialmente registrado (obtido pelo monitoramento feito no *Laboratório de Estudos de Algas Nocivas - LEAN*, da UNIVALI, em Itajaí, SC) foi em janeiro 2007, foi o causado pelo dinoflagelado *Dinophysis acuminata* (DSP) (SCHRAMM e PROENÇA, 2008).

A MICROALGA TÓXICA *Dinophysis acuminata*

O dinoflagelado *D. acuminata* (Fig. 1) é mundialmente encontrado em águas costeiras e oceânicas (HALLEGRAEFF e LUCAS, 1988) sendo produtor de ácido ocadáico (AO) e seus derivados conhecidos como dinophysistoxinas (DTXs). Estas são substâncias lipossolúveis que podem se acumular nas glândulas digestivas (hepatopâncreas) dos moluscos bivalves (ROSSIGNOLI e BLANCO, 2010) causando severos distúrbios gastrointestinais em humanos consumidores desses animais contaminados (PAVELA-VRANCIC et al., 2002). Esta intoxicação, conhecida pela sigla DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) foi descrita pela primeira vez por Yasumoto et al. (1980).

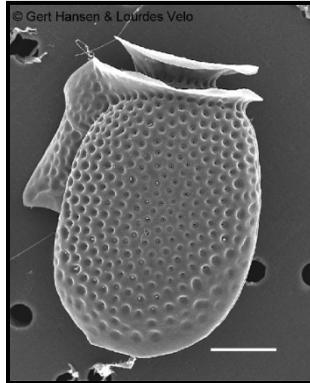


Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura do dinoflagelado *Dinophysis acuminata*. Fonte: Hansen (2009). Barra = 10 μm .

Por muito tempo, os estudos relacionados à ecologia e toxicologia de *Dinophysis* spp. se limitavam aos eventos ocasionados *in situ* (OSAKA e TAKABAYASHI, 1985; CLEMENT et al., 1988; TAYLOR; HAIGH; SUTHERLAND, 1994; GISSELSON; GRANALI; CARLSSON, 1999; JAMES et al., 1999; PAVELA-VRANCIC et al., 2002). Diversas tentativas da cultura *in vitro* de *Dinophysis* spp. em diferentes meios de cultura, foram realizadas, porém sem sucesso (CLEMENT et al., 1988; BERLAND et al., 1995). Vários relatos apontavam para uma nutrição endossimbiótica, sendo esta microalga dependente de outras espécies para subsistir (HANSEN, 1991; HANSEN e CALADO, 1999). Foram através dessas observações que Park et al. (2006) conseguiram obter pela primeira vez com sucesso uma cultura de *D. acuminata* utilizando a microalga *Myrionecta rubra* como alimento. Sua alimentação endossimbiótica foi comprovada em microscopia por observações da inserção de um pedúnculo que se estende do poro flagelar da *D. acuminata* após o contato físico com a espécie predada com posterior extração do citoplasma da microalga *M. rubra* (Fig. 2).

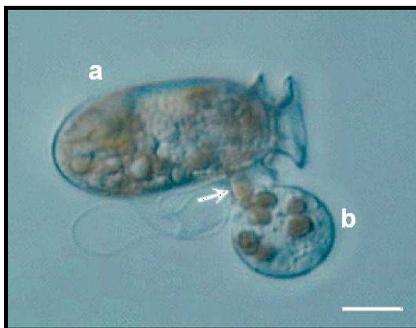


Figura 2: Micrografia mostrando o dinoflagelado *Dinophysis acuminata* (a) realizando extração citoplasmática do ciliado *Myrionecta rubra* (b) através do pedúnculo (seta). Extraído e adaptado de PARK et al. (2006). Barra = 10 µm.

Como mencionado anteriormente, as espécies do gênero *Dinophysis* são reconhecidamente nocivas a outros organismos por sua produção de ácido ocadáico (OA, do inglês: *okadaic acid*) e seus derivados (Fig. 3).

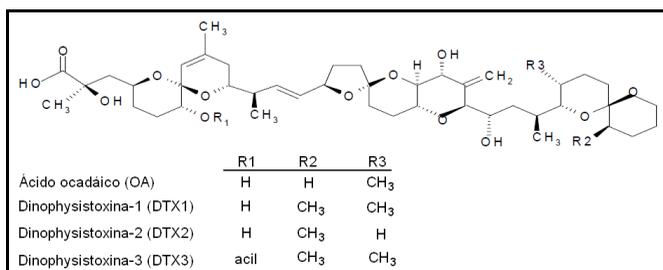


Figura 3: Estrutura química do ácido ocadáico e seus derivados. Adaptado de FAO (2004).

O ácido ocadáico (OA) é um potente inibidor de fosfatases da família das serina/treonina fosfatases, mais especificamente das fosfatases PP1 e PP2A, devido à afinidade das regiões hidrofóbicas do OA com grupamentos aminoacídicos específicos destas enzimas (MAYNES et al., 2001). A PP2A participa da regulação da proteína quinase estando associada à integridade do citoesqueleto celular (SILVA, 2002) que perde seu papel regulador da permeabilidade de solutos pela membrana, resultando na perda passiva de fluidos, quando essa enzima encontra-se inibida pelo OA ou seus derivados

(HALLEGRAEFF, 2003). Esta perda de fluidos caracteriza a diarreia, principal sintoma da DSP em humanos (WRIGHT, 1995).

Ocorrências de *Dinophysis* spp. já foram notificadas em diversos países no mundo incluindo os de grande destaque em termos de produção na maricultura como no Chile (BLANCO; ALVAREZ; URIBE, 2007), Estados Unidos (SWANSON et al., 2010), França (MASSELIN; LASSUS; BARDOUIL, 1992), Japão (ADACHI et al., 2008), Austrália (MADIGAN et al., 2006), Nova Zelândia (MILES et al., 2006) e China (ZHOU et al., 1999). No Brasil já foram identificadas *Dinophysis* spp. em Pernambuco (KOENING e DE MACÊDO, 1999), Rio de Janeiro (FERREIRA et al., 2010), São Paulo (MOSER et al., 2011) e Rio Grande do Sul (HARAGUCHI e ODEBRECHT, 2010).

Dentre as espécies de algas nocivas monitoradas na costa catarinense, o dinoflagelado *D. acuminata* é o mais recorrente. Apenas no litoral de Santa Catarina existem estudos documentados de florações dessa espécie, com produção de toxinas e contaminação de moluscos em vários municípios, desde Palhoça até São Francisco do Sul (PROENÇA, 2009).

É importante destacar que os efeitos das FANs não se limitam apenas no contexto de saúde pública, mas também afetam os ecossistemas que abrigam esses episódios causando mortalidades e alterações de respostas fisiológicas em peixes, moluscos e outros animais aquáticos (SHUMWAY, 1990; LANDSBERG, 2002). O mecanismo de atuação de ficotoxinas em seres humanos e suas conseqüências são bem descritos na literatura, porém pouco se conhece sobre os efeitos nos próprios moluscos bivalves. Por serem sésseis e filtradores de fitoplâncton, esses animais podem estar sujeitos a toxicidade das microalgas e comprometer seu estado de saúde.

SISTEMA IMUNE DE MOLUSCOS BIVALVES

Assim como outros invertebrados, os moluscos são dotados apenas de um sistema imune inato ou natural, sendo desprovidos de um sistema adaptativo com produção de moléculas de reconhecimento altamente específicas (anticorpos e receptores) e células de memória como ocorre nos vertebrados. No entanto, seu sistema imune inato inclui respostas de defesa complexas e eficientes, capazes de protegê-los adequadamente das agressões do ambiente, como o ataque de microrganismos e parasitas, garantindo assim sua integridade corpórea e homeostase.

O sistema imune de bivalves está intimamente associado ao seu sangue ou hemolinfa. Esta é composta por uma fração celular, representada pelos hemócitos, e uma fração líquida ou plasma onde se encontram dispersos os fatores imune humorais (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001; BARRACCO e DA SILVA, 2008). Os hemócitos dos bivalves estão principalmente relacionados com as respostas imune celulares que incluem a fagocitose de micro-organismos e a formação de nódulos e cápsulas em torno dos patógenos invasores. As cápsulas se formam em torno de parasitas de grande tamanho, como hifas de fungos, helmintos e grandes parasitas, que os hemócitos não teriam como fagocitar. Ao invadir o bivalve, estes patógenos são reconhecidos e envolvidos por diversas camadas concêntricas de hemócitos com o objetivo de aprisioná-los e isolá-los dos tecidos do hospedeiro. Já os nódulos, são reações celulares semelhantes às cápsulas e se formam em torno de uma quantidade maciça de microrganismos invasores, cuja fagocitose por si só seria insuficiente de eliminar. Os nódulos hemocíticos tem a mesma função que as cápsulas, ou seja são produzidos para seqüestrar e isolar os micro-organismos invasores (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001; BARRACCO e DA SILVA, 2008).

Basicamente, os hemócitos de bivalves podem ser classificados em dois grandes grupos relacionados à sua complexidade: hemócitos granulares (HG), que contém abundantes grânulos em seu citoplasma e hemócitos hialinos (HH), com pouco ou nenhum grânulo em seu citoplasma. Os HGs parecem constituir as células mais imunocompetentes, estando mais fortemente implicados que os HHs nas reações celulares de defesa e na produção de moléculas tóxicas e microbicidas (HINE, 1999; TERAHARA et al., 2006).

Em situações patológicas, como durante infecções e/ou estresses de origem ambiental, o número e tipo de hemócitos podem se alterar nos bivalves afetados (ALLAM; ASHTON-ALCOX; FORD, 2001; HEGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003; BOUILLY et al., 2006; LAMBERT et al., 2007; MALAGOLI et al., 2007). Desta forma, a determinação dos hemogramas, através da avaliação do número total e diferencial das populações de hemócitos constitui um dos parâmetros imunológicos mais utilizados para monitorar as condições de saúde dos bivalves (BARRACCO e DA SILVA, 2008). Alterações nos hemogramas já foram relatadas em alguns bivalves durante episódios de FANs como em ostras *C. gigas* expostas à floração de *D. acuminata* (MELLO; PROENÇA; BARRACCO, 2010) e mexilhões *Mytilus edulis*

expostos à floração de *Alexandrium fundyense* (GALIMANY et al., 2008a).

Um mecanismo muito importante envolvido nos processos de defesa celular e regulação da homeostase em moluscos bivalves é a apoptose ou morte celular programada, presente em todos os organismos, sendo um processo multifuncional, altamente conservado evolutivamente (SOKOLOVA, 2009). O mecanismo da apoptose é modulado por enzimas chamadas caspases pertencentes a família das proteases (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003), que deflagram o processo e levam a todas as alterações bioquímicas e estruturais que resultam na morte celular. Esse mecanismo pode ser induzido por diversos fatores de estresse sejam eles endógenos ou exógenos. As características típicas do início do processo apoptótico são a diminuição do volume celular, a condensação da cromatina e posteriormente fragmentação celular, cujas vesículas formadas e denominadas de corpos apoptóticos, são reconhecidas pelas células circundantes podendo ser fagocitadas sem desencadear um processo inflamatório (TERAHARA e TAKAHASHI, 2008). Em ostras *C. virginica*, já foi relatada a ocorrência de apoptose durante infecções de protozoários patogênicos *Perkinsus marinus* e *Haplosporidium nelsoni* (SUNILA e LABANCA, 2003; HUGHES et al., 2010), mas também na presença de agentes tóxicos, como o cádmio (SOKOLOVA; EVANS; HUGHES, 2004) ou variações ambientais como salinidade e temperatura (GOEDKEN et al., 2005). Existem poucos estudos sobre o efeito de toxinas produzidas durante as FANs sobre a apoptose em moluscos bivalves, mas estes estudos não revelam uma indução significativa deste processo celular (GALIMANY et al., 2008b).

Após os patógenos serem reconhecidos e aprisionados pelos hemócitos, estes são usualmente neutralizados e/ou destruídos pela produção de uma variedade de moléculas tóxicas e microbicidas, sendo a maioria gerada pelos hemócitos. Dentre estas moléculas, destacam-se as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, os intermediários reativos de oxigênio ou ROIs (do inglês: *reactive oxygen intermediates*) e de nitrogênio ou RNIs (do inglês: *reactive nitrogen intermediates*), os peptídeos antimicrobianos (PAMs) como as defensinas e mitilinas e a ativação do sistema pró-fenoloxidase ou proPO (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001; BARRACCO e DA SILVA, 2008; LI; ZHAO; SONG, 2009).

O sistema proPO é uma cascata proteolítica muito estudada em crustáceos e insetos. A enzima chave neste processo é a fenoloxidase (PO) que se encontra dentro dos hemócitos destes artrópodes. A PO

desencadeia a produção do pigmento escuro melanina que se deposita principalmente nas regiões centrais dos nódulos e cápsulas celulares formados em torno de patógenos invasores (SODERHALL e CERENIUS, 1998; CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008; CERENIUS et al., 2010). O sistema proPO de artrópodes é comumente ativado por componentes da superfície de microrganismos, como os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram negativas e as β -1,3 glicanas da parede de fungos (CERENIUS e SODERHALL, 2004; CERENIUS et al., 2010). Estes componentes são reconhecidos como estranhos e desencadeiam a ativação dos hemócitos que liberam a pró-enzima proPO (CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008). Uma vez liberada para o plasma, a proPO é ativada por clivagem proteolítica, através de uma cascata de proteases e se transforma na enzima ativa PO (CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008). A PO, por sua vez, catalisa a oxidação de compostos fenólicos como a dihidroxi-fenilalanina ou DOPA e gera compostos intermediários tóxicos como os radicais de oxigênio (ROIs) e principalmente as quinonas, que precedem a produção de melanina (CERENIUS et al., 2010).

Vale ressaltar que a participação do sistema proPO na imunologia dos bivalves não foi ainda claramente estabelecida como no caso dos crustáceos e insetos. Alguns autores referem que este sistema não parece ser ativado por componentes da superfície de microrganismos em algumas espécies de bivalves, além do fato dos nódulos e cápsulas de moluscos não apresentarem regiões melanizadas (BARRACCO e DA SILVA, 2008). No entanto, a modulação da atividade da PO vem sendo utilizada como imunoparâmetro em várias espécies de bivalves em relação à ocorrência de infecções ou presença de contaminantes ambientais (PETERS e RAFTOS, 2003; GAGNAIRE; THOMAS-GUYON; RENAULT, 2004; BOUILLY et al., 2006).

O desencadeamento das respostas imunológicas é de um modo geral precedido pelo reconhecimento do corpo estranho invasor. Assim como os outros animais, os bivalves também possuem proteínas de reconhecimento, denominadas PRPs (do inglês: *pattern recognition proteins*) (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). As PRPs são assim denominadas pela sua capacidade de se ligar a padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs (do inglês: *pathogen associated molecular patterns*), como os LPS e peptidoglicanas (PGNs) de bactérias, as β -1,3 glicanas de fungos e o RNA de dupla fita (dsRNA) dos vírus (LOKER et al., 2004; BARRACCO e DA SILVA, 2008; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). As PRPs podem estar dissolvidas no plasma ou estar inseridas nas membranas das células.

Neste último caso, estas proteínas são preferencialmente conhecidas por PRRs (do inglês: *pattern recognition receptors*) (NI et al., 2007).

Dentre as PRPs/PRRs destacam-se as aglutininas ou lectinas que são glicoproteínas de ocorrência geral em todos os seres vivos, incluindo os bivalves. As lectinas têm a propriedade de se ligar especificamente a açúcares da superfície de diferentes células causando sua aglutinação. Desta forma, além de participar no reconhecimento de corpos estranhos através dos açúcares específicos presentes na sua superfície, as lectinas são ainda consideradas moléculas imunofetoras, uma vez que levam a aglutinação dos patógenos invasores, impedindo sua disseminação pela cavidade corpórea do hospedeiro (SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010). Esta propriedade deriva do fato das lectinas serem proteínas no mínimo bivalentes, ou seja, contendo pelo menos dois sítios de ligação para o mesmo açúcar (KENNEDY et al., 1995). As lectinas podem ainda funcionar como opsoninas, facilitando a fagocitose e ou encapsulamento dos patógenos pelos hemócitos (PEARCE et al., 2001; CANESI et al., 2002; VAZQUEZ et al., 2009).

Em bivalves a maioria das lectinas com papel imunológico encontra-se dissolvida no plasma. Estas aglutininas são produzidas de forma constitutiva e são geralmente específicas para açúcares N-acetilados (TUNKIJJANUKIJ et al., 1998).

Devido a seu caráter imunofetor, a concentração de lectinas vem sendo utilizada como parâmetro de saúde em bivalves, já sendo reportadas alterações em seus níveis na hemolinfa durante infecções (KIM et al., 2006), em presença de contaminações ambientais (CHIKALOVETS et al., 2010) e de fatores fisiológicos estressantes (SCHLEDER et al., 2008).

A concentração de proteínas totais (CP) da hemolinfa dos bivalves pode também constituir um importante imunoparâmetro. Os níveis de CP do plasma refletem não apenas a presença de proteínas da fisiologia geral dos bivalves, mas também de proteínas imunológicas, como as lectinas e a PO ou ainda a ocorrência de processos de histólise. Alterações da CP já foram relatadas em bivalves acometidos por infecções (PETERS e RAFTOS, 2003) e também na presença de contaminantes ou variações ambientais (SOUDANT et al., 2004; MALAGOLI et al., 2007; LUNA-GONZALEZ et al., 2008).

A histologia também é uma importante ferramenta empregada na investigação do estado de saúde de moluscos bivalves. Alterações histológicas refletem possíveis danos teciduais, seja pela ação parasitária (DA SILVA; MAGALHAES; BARRACCO, 2002; HINE e THORNE, 2002; LOHRMANN, 2009), seja pela presença de contaminantes

(AUFFRET, 1988; DOVE e SAMMUT, 2007; DAVID; SALAROLI; FONTANETTI, 2008), ou por variações ambientais (BIGNELL et al., 2008) ou ainda durante a exposição de FANs (IMOJEN; HANDLINGER; HALLEGRAEFF, 2005; GALIMANY et al., 2008a; GALIMANY et al., 2008b, 2008c).

Como mencionado anteriormente, a maioria dos estudos sobre maré vermelha ou FANs dizem respeito principalmente ao seu efeito tóxico em humanos, consumidores de pescado contaminado e em seu impacto ecológico. No entanto, pouco se conhece sobre o efeito destas florações e suas toxinas na saúde dos próprios bivalves tanto de cultivo, quanto de estoque natural. Recentemente, porém, algumas evidências dos efeitos de FAN sobre os próprios bivalves foram relatadas. Como exemplo, podemos citar as modificações dos padrões fisiológicos, como a diminuição da amplitude da abertura valvar em ostras (*Crassostrea gigas*) alimentadas com o dinoflagelado *Alexandrium minutum* (TRAN et al., 2010); diminuição da taxa de filtração em ostras (*Crassostrea virginica*), bivalves de areia (*Mercenaria mercenaria*) e mexilhões (*Perna viridis*) alimentados com *A. monilatum* (MAY et al., 2010). Igualmente, modificações nos padrões imunológicos em bivalves já foram notificadas durante episódios de FANs. Como exemplo, podemos citar a diapedese de hemócitos para o intestino em mexilhões (*Mytilus edulis*) após uma floração do dinoflagelado *Prorocentrum minimum* (GALIMANY et al., 2008b); redução do índice apoptótico e fagocítico em hemócitos do molusco de areia *Ruditapes philippinarum* quando alimentado com o dinoflagelado *Karenia selliformis* (HEGARET et al., 2007; DA SILVA et al., 2008); aumento da contagem total de hemócitos no mexilhão *Perna perna* quando afetado pela floração de *Dinophysis acuminata* (MELLO; PROENÇA; BARRACCO, 2010).

O artigo científico deste trabalho será submetido ao periódico *Aquatic Living Resources*.

JUSTIFICATIVA

As florações de microalgas nocivas propiciam o acúmulo de toxinas em moluscos bivalves filtradores dessas florações, acarretando sérios distúrbios em humanos consumidores desses moluscos, porém pouco se conhece sobre os efeitos aos próprios bivalves. Essas florações poderiam ocasionar alterações hemato-imunológicas e comprometer o estado de saúde desses bivalves causando possíveis prejuízos aos cultivos regionais.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito tóxico de florações naturais da microalga nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*), cultivados em Santa Catarina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os hemogramas de ambos bivalves, por ocasião de uma floração natural da alga nociva *D. acuminata* e nos grupos referência.

- Determinar a atividade da enzima fenoxidase da hemolinfa de ambos bivalves, por ocasião de uma floração natural da alga nociva *D. acuminata* e nos grupos referência.

- Determinar a concentração total de proteínas da hemolinfa de ambos bivalves, por ocasião de uma floração natural da alga nociva *D. acuminata* e nos grupos referência.

- Determinar a atividade hemaglutinante da hemolinfa de ambos bivalves, por ocasião de uma floração natural da alga nociva *D. acuminata* e nos grupos referência.

- Determinar a porcentagem de hemócitos apoptóticos de ambos bivalves, por ocasião de uma floração natural da alga nociva *D. acuminata* e nos grupos referência.

- Avaliar possíveis alterações histológicas em diferentes tecidos de ostras durante a floração natural de *D. acuminata*.

Impacto da floração da alga nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*) cultivados em Santa Catarina

Erik Simões¹, Renato Campos Vieira¹, Danielle Ferraz Mello¹, Mathias Alberto Schramm², Patricia Mirella da Silva³, Margherita Anna Barracco¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 113B, 88040900, Florianópolis, SC, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Itajaí, Rua Tijucas 55, 88301360, Itajaí, SC, Brasil

³ Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059900, João Pessoa, PB, Brasil

Florações da microalga nociva *Dinophysis acuminata* vêm se tornando recorrentes na costa de Santa Catarina. No presente estudo avaliou-se a modulação de alguns parâmetros imunológicos em ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna perna* cultivados durante florações naturais de *D. acuminata*. Os bivalves foram coletados durante duas florações, uma na Praia Alegre (PA: 2.950 algas.L⁻¹) e outra na Praia de Zimbros (PZ: 4.150 algas.L⁻¹) e 30 dias após o término das florações (grupo referência). Na PA foram coletados apenas mexilhões. Os parâmetros analisados a partir da hemolinfa foram: os hemogramas ou contagem total (THC) e diferencial de hemócitos (DHC), o índice de hemócitos apoptóticos (IA) por coloração de Hoechst, a atividade da enzima fenoxidase ou PO (produção de DOPAcromo), a concentração de proteínas totais (CP – método de Bradford) e o título aglutinante (TA – eritrócitos de cão) da hemolinfa. Foram ainda realizadas análises histológicas convencionais com coloração HE nas ostras da PZ. Dentre os parâmetros imunológicos analisados, alguns apresentaram alterações significativas em relação aos grupos referência. A THC dos mexilhões variou durante ambas as florações, porém de forma contrastante. Na PA houve uma diminuição (54%) do número de hemócitos (54%) e na PZ um aumento (64%) da THC. A atividade da PO aumentou (50%) nos mexilhões da PA e declinou (40%) nas ostras da PZ. A CP aumentou (66%) apenas nos mexilhões da PZ. Os outros parâmetros imunológicos não se alteraram em relação às florações em ambos bivalves. Não foram observados danos teciduais nas ostras analisadas. Os resultados obtidos não mostraram um comportamento uniforme da modulação dos parâmetros imunológicos em relação às florações de *D. acuminata*.

Contudo, ficou evidente que alguns parâmetros são de fato afetados durante as florações em ambos bivalves, em especial nos mexilhões que parecem ser os mais sensíveis. Estas alterações poderiam tornar estes animais menos resistentes e mais propensos a contrair infecções, impactando desta forma seu cultivo.

Palavras-chave: Algas nocivas / Bivalves cultivados / Parâmetros hemato-imunológicos / Histopatologia / Hemolinfa

1 INTRODUÇÃO

Florações de algas nocivas (FANs) são fenômenos mundialmente conhecidos por seu forte impacto ecológico e econômico nas regiões costeiras onde ocorrem (Svensson, 2003; Dyson e Huppert, 2010). As FANs podem ainda comprometer o cultivo de espécies aquáticas, uma vez que as ficotoxinas produzidas por estas algas podem causar a mortalidade dos animais cultivados e/ou levar ao embargo das áreas afetadas, devido ao acúmulo de ficotoxinas nos tecidos destes animais (Hallegraeff, 2003). Dentre as espécies cultivadas, destacam-se os moluscos bivalves cujo hábito sésil e filtrador resulta na bioacumulação das ficotoxinas em seus tecidos constituindo um sério risco para seus consumidores.

Entre as principais síndromes causadas pelo consumo de bivalves contaminados por ficotoxinas destaca-se a síndrome diarréica (DSP, do inglês *Diarrhoeic Shellfish Poisoning*) ocasionada por algumas espécies de dinoflagelados dos gêneros *Dinophysis* e *Prorocentrum*. As principais toxinas produzidas por essas espécies são o ácido ocadáico (AO) e seus análogos, também conhecidos como dinophysistoxinas que promovem sintomas como náuseas, vômitos e diarreia (Hallegraeff, 2003).

Muitos estudos elucidam os impactos que as ficotoxinas podem causar em seres humanos consumidores de moluscos bivalves contaminados, mas poucos trabalhos investigam os possíveis efeitos destas moléculas nos próprios bivalves que as acumulam.

Como todos os invertebrados, os bivalves são munidos de um sistema imune inato ou natural, intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa. A hemolinfa compreende células circulantes ou hemócitos, responsáveis pelas respostas imune celulares e uma parte líquida ou plasma que contem uma variedade de proteínas plasmáticas relacionadas às respostas imune humorais. Ambas as reações atuam de forma integrada, protegendo os bivalves contra infecções (Hine, 1999; Vargas-Albore e Barracco, 2001). Alguns estudos experimentais demonstram que o sistema imune dos bivalves expostos a altas concentrações de microalgas tóxicas, pode sofrer alterações (da Silva et al., 2008; Galimany et al., 2008a, 2008b; Bricelj et al., 2011). No entanto, muito poucos trabalhos avaliaram o efeito a campo de florações naturais sobre o sistema imune destes animais (Hegaret e Wikfors, 2005a).

A produção brasileira de moluscos bivalves é proveniente principalmente do Estado de Santa Catarina, responsável por cerca de

90% da produção nacional com média de 13.000 t/ano. Trata-se de uma atividade relativamente recente porém de extrema importância para a cultura e economia local. Todas as áreas onde ocorrem cultivos são monitoradas pelo Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves e as águas avaliadas quanto à presença de microalgas potencialmente causadoras de florações tóxicas. Diversas espécies de microalgas nocivas já foram identificadas no litoral brasileiro como o dinoflagelado *Alexandrium tamarense*, causador da síndrome paralisante (PSP, do inglês *paralytic shellfish poisoning*), diatomáceas do gênero *Pseudo-nitzschia*, causadoras da síndrome amnésica (ASP, do inglês *amnesic shellfish poisoning*) e o dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, causador da DSP, sendo esse o mais recorrente no litoral de Santa Catarina (Proença, 2006).

Recentemente Mello et al. (2010) observaram a alteração de alguns índices hemato-imunológicos em três espécies de bivalves cultivados em Santa Catarina (ostras, mexilhões e berbigões) durante uma floração natural de *D. acuminata*. Os autores mostraram que os mexilhões *Perna perna* parecem ser os mais sensíveis à este tipo de floração.

O principal objetivo deste trabalho foi o de ampliar as observações de Mello et al. (2010), avaliando os parâmetros hemato-imunológicos de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*P. perna*) durante florações naturais de *D. acuminata*, em outras localidades do litoral de Santa Catarina a fim de melhor compreender os efeitos destas florações nestes bivalves, cujo cultivo constitui uma importante fonte sócio-econômica para a região.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE ANIMAIS E EXTRAÇÃO DE HEMOLINFA

Mexilhões adultos da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (n = 80) (50-70 mm) e ostras da espécie *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (n = 60) (80-100 mm) foram coletados em fazendas marinhas de cultivo do litoral de Santa Catarina durante florações do dinoflagelado *Dinophysis acuminata*. No período de estudo foram registradas duas florações de *D. acuminata*, uma na Praia Alegre – PA, no município de Penha (26° 46' S; 48° 39' 08" O) (2.950 cél.L⁻¹) em novembro de 2009 e outra na Praia de Zimbros – PZ no município de Bombinhas (27° 11' S; 48° 32' 31" O) (4.150 cél.L⁻¹) em março de 2010 (Fig. 1). Na PA foram obtidos apenas mexilhões, uma vez que não havia cultivo de ostras no período. Já na PZ, ambos os bivalves foram coletados. Os animais foram transportados para o laboratório, onde procedeu-se à coleta imediata de hemolinfa do músculo adutor mediante a inserção de uma agulha (21 G) acoplada a uma seringa de 1 mL (mantidas em gelo). Extraíu-se hemolinfa de 30 animais de cada espécie, em cada localidade, sob forma de 3 *pools* de hemolinfa de 10 animais. Uma nova coleta foi realizada de forma semelhante à descrita, nas mesmas localidades, decorridos 30 dias do término da floração, constituindo o grupo controle ou referência. A hemolinfa extraída de ambos os grupos foi utilizada para avaliar alguns parâmetros imunológicos.

A salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido na água das fazendas foram mensurados no momento da coleta dos animais.

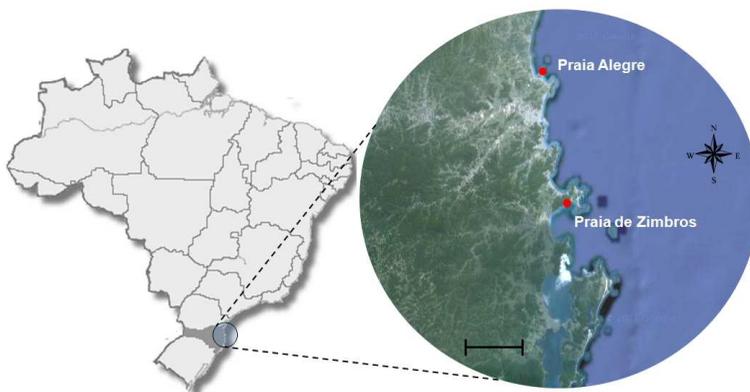


Figura 1: Sítios de coleta de mexilhões e ostras em fazendas marinhas durante os episódios de florações de *D. acuminata*. Barra: 20 km.

2.2 DETERMINAÇÕES DO NÚMERO DE MICROALGAS E DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADÁICO (AO) NOS TECIDOS DOS BIVALVES

A contagem de *D. acuminata* na água do mar foi estimada em microscópio invertido de contraste de fase, após sedimentação das microalgas, de acordo com o método de Utermöhl (1958). A concentração de AO + DTX-1 + DTX-2 foi determinada nos tecidos da glândula digestiva dos animais por cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas (LC MS/MS). Os extratos glandulares (2 g) foram preparados por extração alcoólica (metanol absoluto) (2 x 8 mL em tubo falcon de 15 mL). Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para um balão de 20 mL e alíquotas de 1 mL foram filtradas (0,2 µm, membrana de nylon) e submetidas à análise cromatográfica. A cromatografia foi realizada no sistema RR LC Agilent 1200 equipado com uma coluna de cromatografia rápida Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 50 mm (1,8 µg) a 35°C. A identificação e quantificação do AO e seus análogos foi realizada através de um espectrômetro de massas Applied Biosystem QTrap 3200 calibrado com soluções preparadas a partir de material de referência certificado do NRC Canadá, de acordo com o protocolo desenvolvido por Villar-González et al. (2008). A quantificação do AO foi realizada apenas nos animais provenientes da PZ.

Foram também realizados bioensaios injetando-se intraperitonalmente em três camundongos, alíquotas de um extrato obtido das glândulas digestivas dos moluscos bivalves, sendo considerado positivo quando ocorria a morte de ao menos dois animais no período de 24 horas.

2.3 PROCESSAMENTO DA HEMOLINFA

Uma alíquota de hemolinfa coletada sob forma de *pools* foi fixada em formaldeído 4% em anticoagulante de Alsever modificado (27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0) em diluição conhecida (2:1) para a determinação dos hemogramas e do índice apoptótico. O restante da hemolinfa foi submetido à sonicação (Hielscher DRH-UP50H) por três ciclos de 7 s (22,5 kHz/50 W) a fim de romper os hemócitos e permitir a liberação de seu conteúdo para a fração plasmática. Após sonicação, a hemolinfa foi centrifugada a 4°C, 12.000 x g por 30 min e o sobrenadante, denominado de hemolinfa total (HT: fração plasmática + produtos liberados dos hemócitos) foi utilizado para determinar os diferentes parâmetros hemato-imunológicos.

2.4 DETERMINAÇÃO DOS HEMOGRAMAS

Os hemogramas foram estimados a partir dos *pools* de hemolinfa fixada. A contagem total de hemócitos (THC) foi realizada em câmara de Neubauer em duplicatas, enquanto a contagem diferencial de hemócitos (DHC) foi realizada a partir de esfregaços úmidos de hemolinfa fixada, analisados em microscópio de contraste de fase (MCF). Foram contadas 200 células de cada *pool* de hemolinfa e os resultados foram expressos em porcentagem de hemócitos granulares (HGs), sendo a porcentagem restante ou complementar composta por hemócitos hialinos (HHs).

2.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE APOPTÓTICO (IA)

O IA foi determinado através da contagem de núcleos de hemócitos aparentemente apoptóticos utilizando a coloração de Hoechst. Para tal, esfregaços de hemolinfa fixada dos diferentes *pools* foram tratados por 5 min com tampão McIlvane (0,1 M ácido cítrico, 0,4 M Na_2HPO_4 , pH 5,5) e a seguir incubados por 5 min em uma solução do fluoróforo bisbenzimidaz (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão McIlvane. A porcentagem de núcleos com alterações morfológicas características do processo apoptótico foi estimada em microscopia de fluorescência (365 nm) sendo contados 100 núcleos por *pool* de hemolinfa.

2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (CP) NA HEMOLINFA

A CP dos diferentes *pools* de hemolinfa foi quantificada segundo o método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão. As análises foram realizadas em triplicatas.

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE (PO)

A atividade da PO dos diferentes *pools* de hemolinfa foi quantificada colorimetricamente a partir da formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo utilizando L-DOPA como substrato enzimático e um tampão alcalino (50 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 9,0) como indutor da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicatas, em microplacas de 96 poços de fundo chato. Amostras de HT (50 μL) foram incubadas com um volume igual do tampão indutor e 50 μL do substrato enzimático L-DOPA (3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Nos controles a HT

ou L-DOPA foram substituídos por tampão alcalino. A formação de DOPA-cromo foi avaliada a 492 nm a cada 30 s durante 20 min. Uma unidade enzimática (1 U) correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância por minuto e por mg de proteína a 20°C (Soderhall e Häll, 1984).

2.8 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO AGLUTINANTE DA HEMOLINFA (TA)

O TA dos diferentes *pools* de hemolinfa foi avaliado através de ensaios de hemaglutinação, utilizando-se eritrócitos de cão. Para tal, procedeu-se diluição seriada da HT (50 µL) em TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) em microplacas de 96 poços (fundo em “U”), seguida de incubação com 50 µL de uma suspensão de eritrócitos de cão a 2% em TBS, por 2 h em câmara úmida. Nos controles, a HT foi substituída por TBS. O título aglutinante foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.9 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Ostras provenientes da PZ foram removidas das conchas (15 animais de cada coleta) e fixadas em solução acética de Davidson por 24 h. Os animais fixados foram mergulhados em etanol 70% e seccionados diagonalmente de forma a expor o manto (e gônadas - impregnadas no manto), brânquias e glândula digestiva. O processamento histológico dos tecidos foi realizado de forma convencional, passando pela desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol e impregnação em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm e estes foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). As potenciais alterações histológicas foram avaliadas em microscopia de luz comum.

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar primeiramente a homoscedasticidade, os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett. Os resultados dos diferentes imunoparâmetros foram comparados por análise de variância simples (*one way ANOVA*) e posteriormente pelo teste de comparação de médias de Tukey utilizando o *software* Statística® 7.0. As porcentagens de DHC e IA foram transformadas para arco-seno. Os resultados foram considerados significativos a $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS ABIÓTICOS

A salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) da água das fazendas marinhas nos dias das coletas dos bivalves estão apresentados na tabela 1.

Tabela 2: Parâmetros abióticos nos sítios de coletas

Coleta	Salinidade (‰)	Temperatura (°C)	OD (mg.L ⁻¹)
Floração (PA)	32	25,6	6,1
Referência (PA)	33	27,8	6,8
Floração (PZ)	33	27,7	6,9
Referência (PZ)	32	20,3	6,8

Os parâmetros mantiveram-se homogêneos nas datas das coletas com exceção da temperatura na PZ apresentando uma diferença de cerca de 7°C entre a coleta da floração e do grupo referência, marcando o início do outono.

3.2 CONCENTRAÇÃO DE *D. acuminata* NA ÁGUA E DE ÁCIDO OCADÁICO (AO) NA GLÂNDULA DIGESTIVA DOS BIVALVES

Na costa de Santa Catarina a abundância de 500 cél.L⁻¹ de *D. acuminata* na água do mar é considerada limite, sendo emitido um alerta para as regiões afetadas quando este número é ultrapassado. Florações de *D. acuminata* na PA e na PZ atingiram valores de 2.950 e 4.150 cél.L⁻¹ em novembro de 2009 e março de 2010 respectivamente. Após 30 dias do período das florações a concentração de *D. acuminata* na água do mar em ambas as praias caiu para 0 algas.L⁻¹. Os bioensaios com camundongo foram positivos para as duas florações. A concentração de AO nos extratos das glândulas digestivas dos bivalves foi quantificada apenas durante a floração de PZ e foi 10 vezes superior nos mexilhões (60,1 µg.kg⁻¹) do que nas ostras (5,9 µg.kg⁻¹). Após 30 dias do término da floração houve um forte decréscimo da concentração de AO nos extratos de tecidos dos mexilhões (0,9 µg.kg⁻¹), enquanto que nas ostras não houve mais traços da toxina.

3.3 HEMOGRAMAS

A contagem total de hemócitos (THC) variou significativamente apenas nos mexilhões durante as florações, mas de forma contrastante (Fig. 5-A). Na PA, houve uma diminuição em 56% da THC durante a floração ($2,9 \pm 0,5 \times 10^6$ cél.mL⁻¹) em relação ao grupo referência ($5,2 \pm 1,8 \times 10^6$ cél.mL⁻¹). Já na PZ houve um aumento de 44% da THC durante a floração ($6,9 \pm 1,2 \times 10^6$ cél.mL⁻¹) em relação ao grupo referência ($4,8 \pm 0,4 \times 10^6$ cél.mL⁻¹). Em contraste, as ostras em PZ não apresentaram alterações significativas de sua THC durante a floração e seus valores permaneceram em torno de $2,5 \times 10^6$ cél.mL⁻¹.

Já a contagem diferencial de hemócitos (DHC), apresentada como porcentagem de granulócitos, não mostrou alterações significativas em ambos os bivalves durante ambas as florações (Fig. 5-B). A porcentagem de hemócitos granulares (HG) foi sempre predominante sobre aquela dos hemócitos hialinos (HH) em ambos os bivalves, superando os 80%.

3.4 PORCENTAGEM DE HEMÓCITOS APOPTÓTICOS

O número de hemócitos apresentando núcleos de aspecto apoptótico foi muito baixo durante ambas as florações em ambos os bivalves (menos de 1%) não havendo diferença significativa em relação aos grupos referência.

3.5 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (CP)

A CP da hemolinfa variou significativamente apenas nos mexilhões, durante a floração na PZ (Fig. 5-C). Houve um aumento de 63% nos seus valores ($3,1 \pm 0,5$ mg) em relação ao grupo referência ($1,9 \pm 0,1$ mg). Já a CP das ostras foi inferior ao dos mexilhões (abaixo de 1 mg.mL⁻¹) e não apresentou alteração significativa durante a floração na PZ.

3.6 ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE (PO)

A atividade da PO variou significativamente nos mexilhões e nas ostras durante as florações (Fig. 5-D). Contudo, nos mexilhões, a atividade desta enzima se alterou fortemente apenas durante a floração na PA, onde houve um aumento de 100% da sua atividade ($575,4 \pm 66,7$ U.min⁻¹.mg⁻¹) em relação ao grupo referência ($287,2 \pm 6,7$ U.min⁻¹.mg⁻¹). Por outro lado, não ocorreram diferenças significativas na atividade da PO dos mexilhões durante a floração na PZ e os seus valores

permaneceram entre 120-140 U.min⁻¹.mg⁻¹, cerca de metade dos valores encontrados na PA (grupo referência).

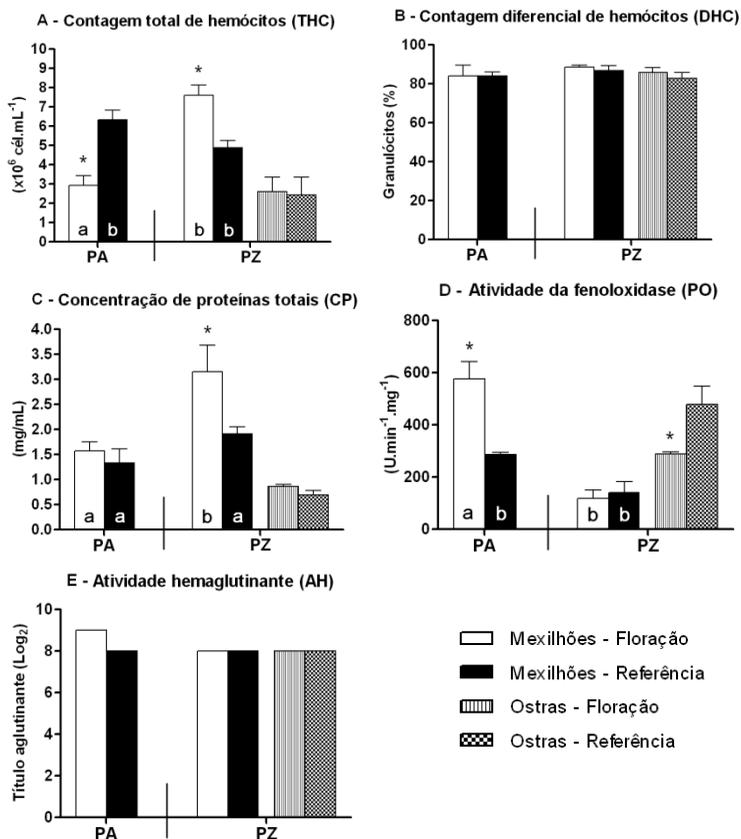


Figura 5: Parâmetros imunológicos em mexilhões coletados na Praia Alegre (PA) e em mexilhões e ostras coletados na Praia de Zimbros (PZ) durante florações da alga *Dinophysis acuminata* (4.150 algas.mL⁻¹ em PA e 2.950 algas.mL⁻¹ em PZ) e decorridos 30 dias de seu término (referência).

* representa diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo exposto à floração e o grupo referência na mesma localidade.

As letras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos de mexilhões das duas localidades.

Contrariamente ao observado nos mexilhões da PZ, a atividade da PO das ostras durante a floração nesta localidade, diminuiu significativamente em cerca de 60% (floração: 298.0 \pm 8,1 U.min⁻¹.mg⁻¹

e grupo referência: $478,8 \pm 68,0 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). É interessante notar que a atividade da PO das ostras declinou durante a floração na PZ, enquanto a dos mexilhões aumentou durante a floração na PA, mas surpreendentemente não variou durante a floração na PZ.

3.7 TÍTULO AGLUTINANTE (TA)

Os títulos aglutinantes dos diferentes *pools* de hemolinfa contra eritrócitos de cão não se alteraram em ambos os bivalves durante as florações (Fig. 5-E). Houve, porém uma tendência a maiores valores nos mexilhões durante a floração na PA (TA = 512) em relação ao grupo referência (TA = 256). O TA da hemolinfa das ostras e mexilhões foram muito semelhantes entre si.

3.8 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

A análise histológica foi realizada apenas em ostras. Não foram verificados danos teciduais nas ostras durante a floração na PZ (Fig. 6). Contudo algumas leves anormalidades foram observadas apenas nos animais expostos à floração, sendo elas a perda de células epiteliais dos túbulos digestivos (Fig. 6-e) e a infiltração de hemócitos (diapedese) para o lúmen do estômago (Fig. 6-g). No entanto essas observações foram apenas pontuais não sendo possível atribuir este efeito à floração da microalga nociva.

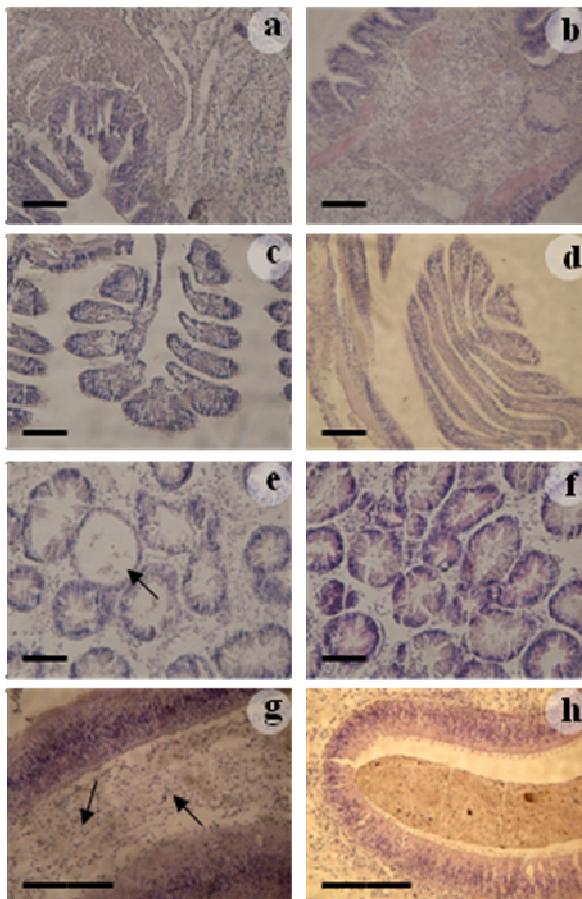


Figura 6: Micrografias mostrando diferentes tecidos de ostras coletadas na Praia de Zimbros (PZ) durante uma floração por *D. acuminata* (a, c, e, g) e 30 dias após o seu término (b, d, f, h). Coloração HE. Estão representadas a borda do manto (a, b); as brânquias (c, d); os túbulos digestivos (descamação indicada pela seta) (e, f); o intestino com infiltração de hemócitos indicada pelas setas (g) e estômago (h). Barra: 100 μ m.

4 DISCUSSÃO

Florações naturais do dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, espécie produtora de ácido ocadáico (AO), têm sido recorrentes no litoral de Santa Catarina, afetando diretamente a maricultura local (Proença, 2006). O presente estudo representou uma ampliação do recente trabalho de Mello et al. (2010) que mostrou que florações naturais de *D. acuminata* em uma região do litoral de Santa Catarina, podiam resultar em alterações de alguns parâmetros hematoimunológicos em três espécies de bivalves cultivados ou extraídos no Estado (mexilhões, ostras e berbigões). No presente estudo, outras regiões afetadas por florações naturais desta mesma espécie de microalga (PA e PZ) foram avaliadas quanto ao seu efeito nos cultivos de mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas*.

Os hemogramas são os principais parâmetros hematoimunológicos utilizados para avaliar as condições de saúde de bivalves, assim como ocorre nos mamíferos. Em nosso estudo, apenas os mexilhões mostraram alteração do número de hemócitos circulantes (THC). Curiosamente, na primeira floração de *D. acuminata* durante a primavera na Praia Alegre (PA), houve uma forte diminuição da THC (54%), enquanto na segunda floração, durante o verão, na Praia de Zimbros (PZ; a mais baixa em abundância de algas) houve, em contraste, um aumento pronunciado (64%) da THC nestes animais em relação ao grupo referência. Os resultados obtidos na segunda floração (PZ) assemelham-se aos obtidos anteriormente por Mello et al. (2010), onde também houve um aumento de cerca de 70% da THC dos mexilhões *P. perna* durante uma floração natural da mesma microalga *D. acuminata* ($17.600 \text{ cél.L}^{-1}$) em outra localidade na costa de Santa Catarina. O fato de ter havido comportamentos distintos na porcentagem de THC de mexilhões *P. perna* (aumento e diminuição) durante duas florações naturais de *D. acuminata* não é bem compreendido. Possivelmente, o aumento da THC poderia indicar uma ativação do sistema imune dos mexilhões, desencadeada pelas ficotoxinas. Já a redução do número de hemócitos circulantes poderia ter resultado da migração destas células para a glândula digestiva visando auxiliar na depuração da ficotoxina, como já descrito por Galimany et al. (2008b). Possivelmente, os animais coletados em ambas as florações passavam por momentos fisiológicos distintos, como diferentes estágios de maturação, tanto em relação à concentração/tempo de duração da floração quanto a variáveis abióticas da região. Contudo, em ambas as florações houve modulação nos valores da THC em *P. perna*. Em

ensaios experimentais, onde mexilhões *Mytilus edulis* foram expostos artificialmente à microalga nociva *Alexandrium fundyense* causadora de PSP, houve uma diminuição de 30% de sua THC (Galimany et al., 2008a). Em contraste, quando estes mexilhões eram expostos à microalga *Prorocentrum minimum* causadora de DSP não houve alteração de sua THC (Galimany et al., 2008b) mostrando que a modulação deste parâmetro pode variar com o tipo de alga nociva.

Já as ostras *C. gigas* puderam ser avaliadas apenas na segunda floração (PZ), uma vez que esta espécie não era cultivada na Praia Alegre. Diferentemente dos mexilhões, não houve variação significativa da THC das ostras durante a floração. O mesmo resultado foi também observado por Mello et al. (2010) durante outra floração natural de *D. acuminata*. Também em ostras *C. virginica* expostas às microalgas *A. fundyense* e *A. catenella*, causadoras de PSP, não houve alteração da THC (Hegaret et al., 2007b). Em contraste, quando esta mesma espécie de ostra era exposta a concentrações de 10^4 cél.mL⁻¹ de *P. minimum* ocorreu um aumento de sua THC (Hegaret e Wikfors, 2005a).

Com relação à contagem diferencial de hemócitos (DHC), não foram evidenciadas diferenças significativas na proporção das populações celulares, tanto em ostras como em mexilhões, durante as florações em nosso estudo. Estes resultados corroboram as observações de Mello et al. (2010) no caso das ostras. Contudo estes autores observaram uma redução (12%) na porcentagem de granulócitos (HG) em mexilhões *P. perna* durante a floração pela mesma microalga. Esta diferença de comportamento pode decorrer do fato da floração estudada por Mello et al. (2010) ser muito mais elevada (> 4x) do que as ocorridas no presente estudo. Alterações das concentrações das populações de hemócitos podem resultar do recrutamento preferencial de certas populações de hemócitos, como os granulócitos para as regiões de contato com as microalgas no sistema digestivo. Em ostras *C. virginica* foi observado uma inicial redução seguida de um aumento de granulócitos quando estas eram alimentadas com *P. minimum* (Hegaret e Wikfors, 2005b). Em contraste, quando essa mesma espécie de ostra, assim como *C. gigas* eram expostas às microalgas nocivas *A. fundyense* e *A. catenella* a DHC não sofreu alteração (Hegaret et al., 2007b).

A exposição de bivalves a ficotoxinas poderia estimular a morte celular por apoptose, como já demonstrado para xenobiontes (Sokolova et al., 2004, 2011; Marcheselli et al., 2011). No entanto, a porcentagem de hemócitos apresentando núcleos com características morfológicas típicas de apoptose foi muito baixa (< 1%) tanto nos mexilhões quanto nas ostras em ambas as florações analisadas. Estes resultados

corroboram os de Mello et al. (2010) que também encontraram valores muito reduzidos de apoptose nos hemócitos de ostras e mexilhões durante uma floração da mesma microalga. Estes resultados sugerem que as ficotoxinas produzidas por *D. acuminata* não induzem apoptose das células imunocompetentes destes bivalves. Galimany et al. (2008b) também encontraram valores bastante reduzidos de hemócitos apoptóticos em mexilhões *M. edulis* alimentados com a microalga nociva *P. minimum* não apresentando diferenças significativas com o grupo controle.

A atividade da fenoxidase é também um importante imunoparâmetro utilizado para monitorar as condições de saúde de invertebrados, em especial crustáceos e insetos (Soderhall et al., 2007; Cerenius et al., 2010). Em bivalves, no entanto, a atuação desta enzima não está ainda claramente evidenciada em seu sistema imune. Contudo, vários autores vêm utilizando este parâmetro como indicativo de situações de estresse durante variações ambientais (Kuchel et al., 2010; Park et al., 2010), infecções (Munoz et al., 2006; Raftos e Butt, 2008) e presença de xenobiontes (Coles et al., 1994; Thiagarajan et al., 2006). Em nosso estudo, a atividade da PO se alterou em ambas as espécies, porém de maneira não uniforme. Nos mexilhões houve um aumento de cerca de 50% durante a primeira floração (PA), mas não se alterou na segunda (PZ). Em contraste, a atividade da PO das ostras diminuiu em cerca de 40% durante a floração na PZ. Estes resultados diferem dos observados por Mello et al. (2010), onde a atividade da PO decresceu (30%) em *P. perna* expostos à floração de *D. acuminata*, mas não variou nas ostras *C. gigas*. Soudant et al. (2010) também obtiveram resultados contrastantes em *C. gigas* alimentadas com a microalga *Alexandrium minutum* produtora de PSP. Em um primeiro experimento os autores observaram uma redução da atividade da PO e num segundo houve um aumento da atividade dessa enzima. Os autores ressaltaram, porém, que as ostras do segundo experimento se encontravam em estágio de maturação gonadal mais avançado do que os animais do primeiro experimento. É bem estabelecido que a maturação gonadal exige um dispêndio energético considerável para os bivalves, e certamente esse fator pode influenciar na resposta imunológica desses animais, o que poderia explicar os resultados diferentes.

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos específicos da superfície de células causando sua aglutinação. Estas proteínas são encontradas no sangue de praticamente todos os organismos, incluindo moluscos bivalves e são consideradas proteínas de reconhecimento padrão (PRP) por serem capazes de reconhecer e se

ligar a açúcares específicos da parede de microorganismos invasores (Song et al., 2010). A concentração de lectinas na hemolinfa de bivalves pode variar em situações de estresse como alterações sazonais (Gullian e Aguirre-Macedo, 2009) e fisiológicas (Schleder et al., 2008) e presença de xenobiontes (Chikalovets et al., 2010). No entanto, não foram verificadas alterações no título aglutinante (TA) em mexilhões e ostras durante as florações de *D. acuminata*. Houve, porém uma tendência a maiores valores nos mexilhões da primeira floração (PA). No estudo semelhante realizado por Mello et al. (2010) também não houve diferença significativa no TA de ambos bivalves durante a floração natural de *D. acuminata*. De forma semelhante, Soudant et al. (2010) não observaram diferenças significativas no TA de ostras *C. gigas* alimentadas com a microalga nociva *A. minutum* e, da Silva et al. (2008) e Hegaret et al. (2009), no berbigão *R. philippinarum* expostos experimentalmente a diferentes microalgas nocivas. Estes resultados em conjunto, apesar de ainda escassos, parecem indicar que os níveis de lectinas na hemolinfa dos bivalves não sejam modulados durante florações de microalgas nocivas.

A concentração de proteínas totais na hemolinfa de bivalves, incluindo as proteínas imunológicas, pode ser afetada durante situações de estresse como alterações ambientais (Gullian e Aguirre-Macedo, 2009), fisiológicas (Schleder et al., 2008) e presença de xenobiontes (Auffret et al., 2006; Figueras et al., 2007). No presente trabalho, apenas os mexilhões da segunda floração (PZ) apresentaram um aumento significativo (66%) da CP de sua hemolinfa durante a floração. Interessantemente, este aumento pronunciado da quantidade de proteínas totais não resultou num aumento específico de proteínas imunológicas como a enzima PO e as lectinas. Resultados semelhantes foram também relatados por Mello et al. (2010) para a CP de *P. perna* que também aumentou durante a floração de *D. acuminata* em contraste à da ostra que não variou. Por outro lado, em outras espécies de bivalves como *R. philippinarum* não houve diferença significativa na CP da hemolinfa quando estes animais eram expostos experimentalmente à microalga nociva *P. minimum* (Hegaret et al., 2009) ou *Karenia selliformis* (Hegaret et al., 2007a).

Análises histológicas foram realizadas apenas nas ostras. Foram analisados os diferentes tecidos expostos ao contato direto com as microalgas nocivas (epitélios do manto, brânquias, palpos labiais, esôfago, estômago, túbulos digestivos e intestino). Algumas anormalidades foram de fato observadas nos tecidos das ostras durante a floração (PZ) como a perda de epitélio dos túbulos digestivos e a

presença de vários hemócitos no lúmen do estômago em contraste às ostras do grupo referência. Porém essas anomalias ocorreram de forma pontual e isolada. Vários estudos apontam para a ocorrência de lesões em diferentes tecidos de bivalves expostos à FANs. Juvenis de vieiras (*Nodipecten subnodosus*) expostos à microalga nociva *Gymnodinium catenatum* apresentaram regiões melanizadas e agregações hemocitárias na borda do manto, brânquias e palpos labiais (Ascencio et al., 2007). Também em sementes de ostras *C. gigas* foram relatadas anormalidades como esfoliações e erosões nos túbulos digestivos após exposição à microalga nociva *P. minimum* (Imojen et al., 2005). Em mexilhões *M. edulis*, Galimany et al. (2008b) observaram a diapedese de hemócitos para o estômago e intestino em animais expostos à microalga *P. minimum*.

Dentre os imunoparâmetros analisados neste estudo, aqueles dos mexilhões *P. perna* parecem ter sido mais afetados que os das ostras *C. gigas* durante florações naturais do dinoflagelado *D. acuminata*. Estes resultados poderiam estar relacionados à maior concentração de AO e seus derivados acumulada nos tecidos dos mexilhões assim como também verificado por Mello et al. (2010). Outros autores também relatam que os mexilhões parecem bioacumular ficotoxinas em maior quantidade que outros bivalves como ostras e vieiras (Reizopoulou et al., 2008; Lindegarth et al., 2009; Kacem et al., 2010). É também possível, que além de bioacumular mais toxinas, os mexilhões apresentem ainda uma depuração mais lenta do que as ostras. Kacem et al. (2010) mostraram que a taxa de depuração de AO de ostras *C. gigas* é de fato mais rápida do que a dos mexilhões *M. galloprovincialis*. Vale (2004) também observou que bivalves de praia (*Donax* spp.) apresentam uma maior taxa de depuração de AO do que os mexilhões *M. edulis*.

Foi ainda relatado que mexilhões *M. edulis* têm uma alimentação preferencial por espécies do gênero *Dinophysis* do que por diatomáceas, grupo conhecidamente utilizado para alimentação de bivalves (Sidari et al., 1998).

Apesar dos resultados obtidos não apresentarem uniformidade ou um padrão consistente de resposta, pode-se deduzir em consonância com as observações de Mello et al. (2010) que os parâmetros imunológicos dos mexilhões são de fato mais afetados do que os das ostras durante florações de *D. acuminata*. Como florações por esta microalga vem se tornando recorrentes na costa de Santa Catarina, seria importante avaliar se os efeitos causados por suas ficotoxinas podem acarretar uma diminuição da resistência dos bivalves cultivados, funcionando como um fator agravante no estabelecimento de infecções, colocando em risco a maricultura regional.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascencio F., N. Estrada, M.D. Romero, A. Campa-Cordova, A. Luna, 2007, Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Comp. Biochem. Phys. C 146(4), 502-510.
- Auffret M., S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, J. Baron, D. Moraga, M. Duchemin, 2006, A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. Ecotoxicol. Environ. Safe 63(3), 393-405.
- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Bricelj V.M., S.E. Ford, C. Lambert, A. Barbou, C. Paillard, 2011, Effects of toxic *Alexandrium tamarense* on behavior, hemocyte responses and development of brown ring disease in Manila clams. Mar. Ecol.-Prog. Ser. 430, 35-48.
- Cerenius L., S.I. Kawabata, B.L. Lee, M. Nonaka, K. Soderhall, 2010, Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends in Biochem. Sci. 35(10), 575-583.
- Chikalovets I.V., O.V. Chernikov, E.A. Shekhova, V.I. Molchanova, P.A. Lukyanov, 2010, Changes in the level of lectins in the mantle of the mussel *Mytilus trossulus* in response to anthropogenic contaminants. Russ. J. Mar. Biol. 36(1), 70-74.
- Coles J.A., S.R. Farley, R.K. Pipe, 1994, Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. 30(4), 367-379.
- da Silva P.M., H. Hegaret, C. Lambert, G.H. Wikfors, N. Le Goic, S.E. Shumway, P. Soudant, 2008, Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions. Toxicon 51(4), 563-573.
- Dyson K., D.D. Huppert, 2010, Regional economic impacts of razor clam beach closures due to harmful algal blooms (HABs) on the Pacific coast of Washington. Harmful Algae 9(3), 264-271.

- Figueras A., M.C. Ordas, J. Albaiges, J.M. Bayona, A. Ordas, 2007, Assessment of in vivo effects of the prestige fuel oil spill on the Mediterranean mussel immune system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52(2), 200-206.
- Galimany E., I. Sunila, H. Hegaret, M. Ramon, G.H. Wikfors, 2008a, Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7(5), 702-711.
- Galimany E., I. Sunila, H. Hegaret, M. Ramon, G.H. Wikfors, 2008b, Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7(5), 630-638.
- Gullian M., L. Aguirre-Macedo, 2009, Seasonal variation of physiological parameters in the Eastern oyster *Crassostrea virginica* from a tropical region of the Gulf of Mexico. *J Shellfish Resour.* 28(3), 439-446.
- Hallegraeff G.M., 2003, Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris, UNESCO, pp. 25-49.
- Hegaret H., P.M. da Silva, I. Sunila, S.E. Shumway, M.S. Dixon, J. Alix, G.H. Wikfors, P. Soudant, 2009, Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371(2), 112-120.
- Hegaret H., P.M. da Silva, G.H. Wikfors, C. Lambert, T. De Bettignies, S.E. Shumway, P. Soudant, 2007a, Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat. Toxicol.* 84(4), 469-479.
- Hegaret H., G.H. Wikfors, 2005a, Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. *Harmful Algae* 4(2), 201-209.
- Hegaret H., G.H. Wikfors, 2005b, Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and

- northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 4(2), 187-199.
- Hegaret H., G.H. Wikfors, P. Soudant, C. Lambert, S.E. Shumway, J.B. Berard, P. Lassus, 2007b, Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 152(2), 441-447.
- Hine P.M., 1999, The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunol.* 9(5), 367-385.
- Imojen P., J.H. Handler, G.M. Hallegraef, 2005, Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. *Harmful Algae* 4(1), 61-74.
- Kacem I., N. Bouaïcha, B. Hajjem, 2010, Comparison of okadaic acid profiles in mussels and oysters collected in Mediterranean Lagoon, Tunisia. *Int. J. Biol.* 2(2), 238-245.
- Kuchel R.P., D.A. Raftos, S. Nair, 2010, Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricata*. *Fish & Shellfish Immunol.* 29(6), 930-936.
- Lindegarth S., T. Torgersen, B. Lundve, M. Sandvik, 2009, Differential retention of okadaic acid (OA) group toxins and pectenotoxins (PTX) in the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.) and european flat oyster, *Ostrea edulis* (L.). *J. Shellfish Resour.* 28(2), 313-323.
- Marcheselli M., P. Azzoni, M. Mauri, 2011, Novel antifouling agent-zinc pyrithione: Stress induction and genotoxicity to the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 102(1-2), 39-47.
- Mello D.F., L.A.O. Proença, M.A. Barracco, 2010, Comparative study of various immune parameters in three bivalve species during a natural bloom of *Dinophysis acuminata* in Santa Catarina Island, Brazil. *Toxins* 2(5), 1166-1178.
- Munoz P., J. Meseguer, M.A. Esteban, 2006, Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunol.* 20(1), 12-19.

- Park S.W., J.H. Yu, M.C. Choi, K.I. Park, 2010, Effects of anoxia on immune functions in the Surf Clam *Mactra veneriformis*. Zool. Stud. 49(1), 94-101.
- Proença L.A.O., 2006, Algal blooms in coastal zones: Examples of harmful impacts from the Brazilian coast. J. Coast. Res. 1, 76-78.
- Raftos D., D. Butt, 2008, Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. Dev. Comp. Immunol. 32(3), 299-306.
- Reizopoulou S., E. Stroglyoudi, A. Giannakourou, K. Pagou, L. Hatzianestis, C. Pyrgaki, E. Graneli, 2008, Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata*. Harmful Algae 7(2), 228-234.
- Schleder D.D., M. Kayser, S. Suhnel, J.F. Ferreira, G.S. Rupp, M.A. Barracco, 2008, Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. Aquac. 280(1-4), 256-263.
- Sidari L., P. Nichetto, S. Cok, S. Sosa, A. Tubaro, G. Honsell, R. Della Loggia, 1998, Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. Mar. Biol. 131(1), 103-111.
- Soderhall K., L. Häll, 1984, Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. Biochim. Biophys. Acta 797(1), 99-104.
- Soderhall K., H. Liu, P. Jiravanichpaisal, L. Cerenius, B.L. Lee, I. Sorderhall, 2007, Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 282(46).
- Sokolova I.M., S. Evans, F.M. Hughes, 2004, Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. J. Exp. Biol. 207(Pt 19), 3369-3380.
- Sokolova I.M., B. Foster, S. Grewal, O. Graves, F.M. Hughes, 2011, Copper exposure affects hemocyte apoptosis and *Perkinsus*

- marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). Fish & Shellfish Immunol. 31(2), 341-349.
- Song L.S., L.L. Wang, L.M. Qiu, H.A. Zhang, 2010, Bivalve Immunity. In: Söderhäll K. (Ed.) Invertebr. Immun., pp. 44-65.
- Soudant P., H. Haberkorn, C. Lambert, N. Le Goic, M. Gueguen, J. Moal, E. Palacios, P. Lassus, 2010, Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 97(2), 96-108.
- Svensson S., 2003, Depuration of okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. Aquac. 218(1-4), 277-291.
- Thiagarajan R., S. Gopalakrishnan, H. Thilagam, 2006, Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51(3), 392-399.
- Utermöhl H., 1958, Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodic. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9, 1-38.
- Vale P., 2004, Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. Toxicon 44(2), 123-134.
- Vargas-Albores F., M.A. Barracco, 2001, Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. In: Maeda-Martinez A.N. (Ed.) Los Moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura, Editorial Limusa, pp. 127-146.
- Villar-González A., M.L. Rodríguez-Velasco, L.M. Botana, 2008, Pre-validación de un método de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas. In: Gilabert J. (Ed.) Avances y Tendencias en Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena, pp. 295-301.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ADACHI, M. et al. Occurrence of toxic *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae) in Uranouchi Inlet, Japan. **Fisheries Science**, v. 74, n. 6, p. 1315-1321, 2008.

ALLAM, B.; ASHTON-ALCOX, K. A.; FORD, S. E. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 5-6, p. 365-375, 2001.

ALVES, T. P. et al. Implementação e avaliação do monitoramento de algas nocivas e de ficotoxinas em um cultivo de moluscos em Florianópolis - SC. **Atlântica**, v. 32, n. 1, p. 71-77, 2010.

ANDERSON, D. M.; GLIBERT, P. M.; BURKHOLDER, J. M. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. **Estuaries**, v. 25, n. 4B, p. 704-726, 2002.

ARCHAMBAULT, M. C. et al. Effects of suspended and sedimented clays on juvenile hard clams, *Mercenaria mercenaria*, within the context of harmful algal bloom mitigation. **Marine Biology**, v. 144, n. 3, p. 553-565, 2004.

AUFFRET, M. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 46, n. 1-3, p. 101-107, 1988.

BARRACCO, M. A.; DA SILVA, P. M. Hemolinfa e Sistema Imune. In: RESGALLA JR, C.; WEBER, L. I., et al (Ed.). **Mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p.85-102.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunología del camarón. In: VIELKA, M. Q. e CUÉLLAR-ANJEL, J. (Ed.). **Guía técnica: Patología y inmunología de camarones penaeidos**. Panamá: CYTED, 2008. p.169-224.

BEAULIEU, S. E.; SENGCO, M. R.; ANDERSON, D. M. Using clay to control harmful algal blooms: deposition and resuspension of clay/algal flocs. **Harmful Algae**, v. 4, n. 1, p. 123-138, 2005.

BERLAND, B. R. et al. Recent Aspects of Nutrition in the Dinoflagellate *Dinophysis* Cf *Acuminata*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 9, n. 2, p. 191-198, 1995.

BIGNELL, J. P. et al. Mussel histopathology: and effects of season, disease and species. **Aquatic Biology**, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2008.

BLANCO, J.; ALVAREZ, G.; URIBE, E. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 710-716, 2007.

BOLCH, C. J. S.; DE SALAS, M. F. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium "tamarensis complex"* to Australasia. **Harmful Algae**, v. 6, n. 4, p. 465-485, 2007.

BOUILLY, K. et al. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 2, p. 149-156, 2006.

BUESTEL, D. et al. History, status, and future of oyster culture in France. **Journal of Shellfish Research**, v. 28, n. 4, p. 813-820, 2009.

BUTRON, A.; ORIVE, E.; MADARIAGA, I. Potential risk of harmful algae transport by ballast waters: The case of Bilbao Harbour. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 747-757, 2011.

CANESI, L. et al. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 6, p. 469-476, 2002.

CERENIUS, L. et al. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 10, p. 575-583, 2010.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.

- CERENIUS, L.; SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 116-126, 2004.
- CHIKALOVETS, I. V. et al. Changes in the level of lectins in the mantle of the mussel *Mytilus trossulus* in response to anthropogenic contaminants. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 36, n. 1, p. 70-74, 2010.
- CLEMENT, M. D. et al. New ecological and ultrastructural data on the dinoflagellate *Dinophysis* sp. from the French coast. **Marine Biology**, v. 97, n. 1, p. 37-44, 1988.
- CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**, v. 193, n. 1, p. 10-21, 2003.
- DA SILVA, P. M. et al. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 563-573, 2008.
- DA SILVA, P. M.; MAGALHAES, A. R. M.; BARRACCO, M. A. Effects of *Bucephalus* sp (Trematoda : bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in ratones Grande Island, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, n. 3, p. 154-162, 2002.
- DAVID, J. A. D.; SALAROLI, R. B.; FONTANETTI, C. S. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1293-1299, 2008.
- DOVE, M. C.; SAMMUT, J. Histological and feeding response of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*, to acid sulfate soil outflows. **Journal of Shellfish Research**, v. 26, n. 2, p. 509-518, 2007.
- DUINKER, A. et al. The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). **Harmful Algae**, v. 6, n. 2, p. 288-300, 2007.

DYSON, K.; HUPPERT, D. D. Regional economic impacts of razor clam beach closures due to harmful algal blooms (HABs) on the Pacific coast of Washington. **Harmful Algae**, v. 9, n. 3, p. 264-271, 2010.

EPAGRI/CEDAP. **Síntese informativa da produção de moluscos 2009**.

FAO. **Marine Biotoxins**. Roma. 80. 2004.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. DEPARTMENT, F. F. A. A. Rome 2007.

FAO. **The State of Food and Agriculture**. Rome 2009.

FAO. **FAO yearbook of fishery and aquaculture statistics 2010b**.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome 2010a.

FERREIRA, J. F.; NETO, F. M. D. O. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. Florianópolis, 24/02/2011 2006. Disponível em: <
<http://www.cca.ufsc.br/~jff/disciplinas/cultivodemoluscos/pdf/Cultivo%20de%20Moluscos%20em%20Santa%20Catarina%202006.pdf>>.

FERREIRA, V. D. M. et al. Produção da ficotoxina diarreica ácido ocadaico associada à microalga *Dinophysis acuminata* (Ehrenberg 1839) na baía de Sepetiba, RJ e sua implicação para a saúde pública. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 87-90, 2010.

GAGNAIRE, B.; THOMAS-GUYON, H.; RENAULT, T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, n. 4, p. 501-512, 2004.

GALIMANY, E. et al. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*. **Harmful Algae**, v. 7, n. 1, p. 91-98, 2008c.

GALIMANY, E. et al. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*:

Histopathology, immune responses, and recovery. **Harmful Algae**, v. 7, n. 5, p. 702-711, 2008a.

GALIMANY, E. et al. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. **Harmful Algae**, v. 7, n. 5, p. 630-638, 2008b.

GAYOSO, A. M.; FULCO, V. K. Occurrence patterns of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech populations in the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), with observations on ventral pore occurrence in natural and cultured cells. **Harmful Algae**, v. 5, n. 3, p. 233-241, 2006.

GISSELSON, L. A.; GRANALI, E.; CARLSSON, P. Using cell cycle analysis to estimate in situ growth rate of the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*: drawbacks of the DNA quantification method. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 184, p. 55-62, 1999.

GOEDKEN, M. et al. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. **Journal of Shellfish Research**, v. 24, n. 1, p. 177-183, 2005.

HALLEGRAEFF, G. M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms - a formidable predictive challenge. **Journal of Phycology**, v. 46, n. 2, p. 220-235, 2010.

HALLEGRAEFF, G. M. et al. **Manual on harmful marine microalgae**. 21. Unesco, 2003. 793 ISBN 9789231038716.

HALLEGRAEFF, G. M.; LUCAS, I. A. N. The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae) - photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. **Phycologia**, v. 27, n. 1, p. 25-42, 1988.

HANSEN, G. ***Dinophysis acuminata* from Spain**. 21988_DINOPHYSIS-ACUMINATA.JPG: World Register of Marine Species. 741x959 pixels 2009.

HANSEN, P. J. *Dinophysis* - a planktonic dinoflagellate genus which can act both as a prey and a predator of a ciliate. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 69, n. 1-2, p. 201-204, 1991.

- HANSEN, P. J.; CALADO, A. J. Phagotrophic mechanisms and prey selection in free-living dinoflagellates. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 382-389, 1999.
- HARAGUCHI, L.; ODEBRECHT, C. Dinophysiales (Dinophyceae) no extremo Sul do Brasil (inverno de 2005, verão de 2007). **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 101-114, 2010.
- HEGARET, H. et al. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 469-479, 2007.
- HEGARET, H. et al. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve molluscs. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 361, p. 169-179, 2008.
- HEGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, n. 2, p. 237-248, 2003.
- HELM, M. M. **Cultured Aquatic Species Information Programme: *Crassostrea gigas***. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome 2005.
- HINE, P. M. The inter-relationships of bivalve haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 5, p. 367-385, 1999.
- HINE, P. M.; THORNE, T. *Haplosporidium* sp (Alveolata : Haplosporidia) associated with mortalities among rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, n. 2, p. 123-133, 2002.
- HUGHES, F. M. et al. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 2, p. 247-257, 2010.
- IMOJEN, P.; HANDLINGER, J. H.; HALLEGRAEFF, G. M. Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. **Harmful Algae**, v. 4, n. 1, p. 61-74, 2005.

JAMES, K. J. et al. Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. **Toxicon**, v. 37, n. 2, p. 343-357, 1999.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

KACEM, I. B., NOUREDDINE; HAJJEM, BÉCHIR Comparison of okadaic acid profiles in mussels and oysters collected in Mediterranean Lagoon, Tunisia. **International Journal of Biology**, v. 2, n. 2, p. 238-245, 2010.

KAO, C. Y. Tetrodotoxin saxitoxin and their significance in study of excitation phenomena. **Pharmacological Reviews**, v. 18, n. 2, p. 997-1049, 1966.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995.

KIM, Y. M. et al. Lectin from the manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 26854-26864, 2006.

KOENING, M. L.; DE MACÊDO, S. J. Hydrology and phytoplankton community structure at Itamaraca-Pernambuco (Northeast Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 4, p. 381-392, 1999.

LAMBERT, C. et al. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. **Aquaculture**, v. 270, n. 1-4, p. 276-288, 2007.

LANDSBERG, J. H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 2, p. 113-390, 2002.

LAUCKNER, G. Diseases of mollusca: bivalvia. In: KINNE, O. (Ed.). **Diseases of marine animals**. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland, vol. 2, p.1028, 1983.

LAVOIE, R. E. Oyster culture in North America: History, present and future. The 1st International Oyster Symposium, 2005. Tokyo.

LI, C. H.; ZHAO, J. M.; SONG, L. S. A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. **Molluscan Research**, v. 29, n. 1, p. 17-26, 2009.

LINDEGARTH, S. et al. Differential retention of okadaic acid (OA) group toxins and pectenotoxins (PTX) in the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.) and european flat oyster, *Ostrea edulis* (L.). **Journal of Shellfish Research**, v. 28, n. 2, p. 313-323, 2009.

LOHRMANN, K. B. How healthy are cultivated scallops (*Argopecten purpuratus*) from Chile? A histopathological survey. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 44, n. 1, p. 25-47, 2009.

LOKER, E. S. et al. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 10-24, 2004.

LUNA-GONZALEZ, A. et al. Seasonal variations in the immunological and physiological parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía de Macapule (Sinaloa, Mexico). **Aquaculture Research**, v. 39, n. 14, p. 1488-1497, 2008.

MADIGAN, T. L. et al. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. **Harmful Algae**, v. 5, n. 2, p. 119-123, 2006.

MAFRA JR, L. L. **Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá, PR: Subsídios para o monitoramento**. 2005. 158 (Doctor). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MALAGOLI, D. et al. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 1, p. 171-177, 2007.

MASSELIN, P.; LASSUS, P.; BARDOUIL, M. High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the french coast. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, n. 4, p. 385-389, 1992.

MAY, S. P. et al. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium monilatum* on survival, grazing and behavioral response of three ecologically important bivalve molluscs. **Harmful Algae**, v. 9, n. 3, p. 281-293, 2010.

MAYNES, J. T. et al. Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 44078-82, 2001.

MELLO, D. F.; PROENÇA, L. A. D. O.; BARRACCO, M. A. Comparative study of various immune parameters in three bivalve species during a natural bloom of *Dinophysis acuminata* in Santa Catarina Island, Brazil. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1166-1178, 2010.

MILES, C. O. et al. Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 152-159, 2006.

MOSER, G. A. O. et al. Distribuição espacial e temporal do microfitoplâncon, com ênfase em espécies potencialmente nocivas, em seis áreas de maricultura entre Caraguatatuba e Ubatuba (SP). V Simpósio Brasileiro de Oceanografia, 2011. Santos.

MPA. Participação da aquicultura no setor pesqueiro nacional. 2010. Disponível em: < www.mpa.gov.br >. Acesso em: 24/02/2011.

NI, D. J. et al. Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 6, p. 548-558, 2007.

OLIVEIRA, C. A. M. **Variações espaciais e temporais da biomassa fitoplanctônica em uma área de malacocultura no município de Anchieta, ES**. 2005. 52 (Bacharel). Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

OSAKA, K.; TAKABAYASHI, N. Annual change in distribution of the toxic dinoflagellate *Dinophysis fortii* along the coast of Northern Japan. **Bulletin of Marine Science**, v. 37, n. 2, p. 773-773, 1985.

OTERO, J. J. G. Epidemiological impact of diarrhetic toxins. In: BOTANA, L. M. (Ed.). **Seafood and freshwater toxins**:

pharmacology, physiology and detections. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 3, p.962.

PAERL, H. W.; HALL, N. S.; CALANDRINO, E. S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 10, p. 1739-1745, 2011.

PAN, G.; CHEN, J.; ANDERSON, D. M. Modified local sands for the mitigation of harmful algal blooms. **Harmful Algae**, v. 10, n. 4, p. 381-387, 2011.

PAN, G. et al. Removal of harmful cyanobacterial blooms in Taihu Lake using local soils. III. Factors affecting the removal efficiency and an in situ field experiment using chitosan-modified local soils. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 2, p. 206-212, 2006.

PARK, M. G. et al. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 45, n. 2, p. 101-106, 2006.

PAVELA-VRANCIC, M. et al. DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1601-1607, 2002.

PEARCE, S. et al. Humoral opsonins of the tunicate, *Pyura stolonifera*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 5-6, p. 377-385, 2001.

PEPERZAK, L.; POELMAN, M. Mass mussel mortality in The Netherlands after a bloom of *Phaeocystis globosa* (prymnesiophyceae). **Journal of Sea Research**, v. 60, n. 3, p. 220-222, 2008.

PETERS, R.; RAFTOS, D. A. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Aquaculture**, v. 223, n. 1-4, p. 29-39, 2003.

POLI, C. R. L., JACK. **Desenvolvimento do cultivo de moluscos no Estado de Santa Catarina** 1998.

PROENÇA, L. A. O. et al. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. **Harmful Algal News**, p. 19-20, 2007.

PROENÇA, L. A. O. **Certificados de ensaios**. Itajaí: EPAGRI. Disponível em <<http://pecmb.wordpress.com/download-de-laudos/>>. 2009.

PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; SOUZA, N. P. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Grahan in southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. **Atlântica**, v. 23, p. 59-65, 2001.

PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; FONSECA, R. S. Screening the toxicity and toxin content of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* (Ehrenberg) in Northeast Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. 204-215, 2009.

REIZOPOULOU, S. et al. Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata*. **Harmful Algae**, v. 7, n. 2, p. 228-234, 2008.

RÖRIG, L. R. et al. Monitorização de microalgas planctônicas potencialmente tóxicas na área de maricultura da enseada de Armação de Itapocoroy - Penha, SC. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 71-79, 1998.

ROSSIGNOLI, A. E.; BLANCO, J. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 221-226, 2010.

SATÔ, S.; PARANAGUÁ, M. N.; ESKINAZI, E. On the mechanism of red tide of *Trichodesmium* in Recife northeastern Brazil, with some considerations of the relation to the human disease, "Tamandaré Fever". *Trabalhos do Instituto Oceanográfico da Universidade Federal de Pernambuco*, 1963. Recife. p.7-50.

SCHLEDER, D. D. et al. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten*

nodosus in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 256-263, 2008.

SCHRAMM, M. A. **Ocorrência de toxinas amnésicas, paralisantes e diarréicas na carne de moluscos cultivados em Santa Catarina: Segurança alimentar e saúde pública**. 2008. 112 (Doutorado). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHRAMM, M. A.; PROENÇA, L. A. O. **Monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas**. Panorama da Aquicultura. 18: 48-55 p. 2008.

SCHRAMM, M. A. et al. Toxinas paralisantes em mexilhão *Perna perna* em áreas de cultivo da costa Sul do Brasil: estudo de caso. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 443-450, 2006.

SENGCO, M. R.; ANDERSON, D. M. Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 169-172, 2004.

SENGCO, M. R. et al. Removal of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) and its toxins using clay minerals. **Harmful Algae**, v. 4, n. 2, p. 261-274, 2005.

SHUMWAY, S. E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 21, n. 2, p. 65-104, 1990.

SHUMWAY, S. E. et al. Effect of yellow loess on clearance rate in seven species of benthic, filter-feeding invertebrates. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 15, p. 1391-1402, 2003.

SILVA, T. M. A. **Relação entre o efeito citotóxico de biocompostos sobre linfócitos T e a atividade de fosfatases**. 2002. 124 (Tese de Doutorado). Departamento de bioquímica, UNICAMP, Campinas.

SMITH, V. J.; DESBOIS, A. P.; DYRYNDA, E. A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1213-1262, 2010.

SODERHALL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 1, p. 23-28, 1998.

SOKOLOVA, I. M. Apoptosis in molluscan immune defense. **Invertebrate Survival Journal**, v. 6, n. 1, p. 49-58, 2009.

SOKOLOVA, I. M.; EVANS, S.; HUGHES, F. M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. Pt 19, p. 3369-80, 2004.

SONG, Y. C. et al. Removal of *Cochlodinium polykrikoides* by dredged sediment: A field study. **Harmful Algae**, v. 9, n. 2, p. 227-232, 2010.

SOUDANT, P. et al. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. **Aquaculture**, v. 229, n. 1-4, p. 401-418, 2004.

SUNILA, I.; LABANCA, J. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Dis Aquat Organ**, v. 56, n. 2, p. 163-70, 2003.

SVENSSON, S. Depuration of okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. **Aquaculture**, v. 218, n. 1-4, p. 277-291, 2003.

SWANSON, K. M. et al. The 2008 Texas *Dinophysis ovum* bloom: Distribution and toxicity. **Harmful Algae**, v. 9, n. 2, p. 190-199, 2010.

TAYLOR, F. J. R.; HAIGH, R.; SUTHERLAND, T. F. Phytoplankton ecology of Sechart Inlet, a fjord system on the British Columbia coast. II. Potentially harmful species. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 103, n. 1-2, p. 151-164, 1994.

TERAHARA, K.; TAKAHASHI, K. G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 2, p. 131-137, 2008.

TERAHARA, K. et al. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 8, p. 667-683, 2006.

TOYOFUKU, H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1735-1745, 2006.

TRAN, D. et al. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. **Aquaculture**, v. 298, n. 3-4, p. 338-345, 2010.

TREASURER, J. W.; HANNAH, F.; COX, D. Impact of a phytoplankton bloom on mortalities and feeding response of fanned Atlantic salmon, *Salmo salar*, in west Scotland. **Aquaculture**, v. 218, n. 1-4, p. 103-113, 2003.

TUNKIJJANUKIJ, S. et al. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 119, n. 4, p. 705-713, 1998.

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTINEZ, A. N. (Ed.). **Los Moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**: Editorial Limusa, v.1, 2001. p.127-146.

VAZQUEZ, L. et al. Immunity mechanisms in crustaceans. **Innate Immunity**, v. 15, n. 3, p. 179-188, 2009.

WRIGHT, J. L. C. Dealing with seafood toxins - Present approaches and future-options. **Food Research International**, v. 28, n. 4, p. 347-358, 1995.

YASUMOTO, T. et al. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 46, n. 11, p. 1405-1411, 1980.

ZENEBON, O.; PREGNOLATTO, N. P. Memórias técnico-científicas da divisão de bromatologia e química. In: ANTUNES, J. L. F.; NASCIMENTO, C. B., *et al* (Ed.). **100 anos de Saúde Pública**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992. p.173-198.

ZHOU, M. et al. A recent shellfish toxin investigation in China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 331-334, 1999.

ZOU, H. et al. Removal of cyanobacterial blooms in Taihu Lake using local soils. II. Effective removal of *Microcystis aeruginosa* using local soils and sediments modified by chitosan. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 2, p. 201-205, 2006.