



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

Efeito do manejo sobre a sobrevivência, ocorrência de patógenos e respostas imune da ostra *Crassostrea gigas* cultivada no Sul do Brasil

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

Orientadora: Aimê Rachel Magenta Magalhães
Co-orientadora: Simone Sühnel

CELENE DA SILVA IVACHUK

Florianópolis/SC
2012

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

Ivachuk, Celene da Silva

Efeito do manejo sobre a sobrevivência, ocorrência de patógenos e respostas imune da ostra *Crassostrea gigas* cultivada no Sul do Brasil [dissertação] / Celene da Silva Ivachuk ; orientadora, Aimê Rachel Magenta Magalhães ; co-orientadora, Simone Sühnel. - Florianópolis, SC, 2012.

67 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Manejo. 3. HSP70. 4. THC. 5. Histopatologia. I. Magalhães, Aimê Rachel Magenta. II. Sühnel, Simone. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Efeito do manejo sobre a sobrevivência, ocorrência de patógenos e respostas imune da ostra *Crassostrea gigas* cultivada no Sul do Brasil

Por

CELENE DA SILVA IVACHUK

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 Aqüicultura.

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães – *Orientadora*

Dra. Guisla Boehs

Dra. Maria Alcina Martins de Castro

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu trilhe esta jornada, com fé e saúde.

A toda minha família que mesmo longe sempre esteve presente, em especial à minha mãe e à minha avó por todo o apoio e companheirismo proporcionados desde sempre, sendo um exemplo para mim de dedicação e força.

À professora Aimê Rachel M. Magalhães pela orientação, por todo o apoio e pela confiança em meu trabalho. Obrigada também pelas horas de risos e descontração durante os encontros e viagens.

À grande amiga e co-orientadora Simone Sünhel, a irmã mais velha em Florianópolis. Obrigada por tudo!

A todos meus companheiros do LAMEX. Tudo se tornou possível porque contei com o apoio, ajuda e carinho de vocês, agradecimento em especial ao Leonardo, Vitor, Marcelo, Stephanie, Thaís, Mirelle, Luana, Jennifer, Cristina, Ana Lúcia, Penélope, Ana e Maria Alcina, que se tornaram grandes amigos, obrigada pelas horas de trabalho e risos!

Ao Itamar e ao Bruno por todo o suporte e apoio durante a realização dos trabalhos de campo. Obrigada também pelas horas de descontração e pelo cafezinho.

À Ana Lúcia, por toda a ajuda na realização das técnicas histológicas e ao Rafael “Budha” (*in memoriam*) pelo apoio e por me apresentar pela primeira vez o Sambaquí, foi a partir desse dia que eu decidi o que queria me tornar.

À equipe do laboratório LABCAI, em especial ao biólogo Jacó e à Dra. Juliana Moser.

A todos do NEPAQ, pelas conversas de corredor e pelas confraternizações animadas!

Ao professor Dr. Jaime Ferreira e à professora Dra. Marguerita A. Barraco pela ajuda na elaboração do projeto.

À professora Dra. Susete Wambier Christo pelo incentivo e apoio desde sempre.

Às minhas amigas Marcella, Anelise, Sabrina e Andressa, pela amizade e por terem me acolhido e feito com que Florianópolis ficasse mais divertida.

A todos os colegas de mestrado pelo companheirismo.

Ao Carlito, pela paciência e auxílio durante todo o período do mestrado.

Dedico este trabalho à minha mãe Lanir e à vovó Francisca.

*Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos
muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam!
Eles sabem que possuem asas...”*

Victor Hugo

RESUMO

Na aquicultura, o estresse causado por práticas de manejo nos cultivos pode comprometer a produção de moluscos bivalves marinhos, deprimindo imunologicamente os animais e podendo levá-los a episódios de mortalidade. Com o objetivo de gerar informações sobre a influência do manejo sobre os aspectos imunológicos, histopatologia e sobrevivência das ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivadas, foi conduzido experimento na área aquícola do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, na Praia da Ponta do Sambaquí, Florianópolis/SC, no período de dezembro de 2010 a março de 2011 e junho a setembro de 2011. Foram analisados dois tratamentos: sem manejo (SM) e com manejo (CM), que constou no jateamento das lanternas de cultivos e das ostras. Foram coletados animais mensalmente nos dois tratamentos e formados *pools* de hemolinfa, para análise da expressão da proteína de choque térmico – HSP70 e para a contagem total de hemócitos – THC. Também foram preparadas lâminas para análises histopatológicas. Os valores de sobrevivência foram estatisticamente iguais nas ostras CM e SM. A THC das ostras também não foi influenciada pelo manejo, mas a temperatura da água influenciou esse fator, sendo que os maiores valores de THC foram observados no verão. A quantificação relativa na expressão da proteína HSP70 foi maior nas ostras CM. Maiores prevalências de protozoários do tipo *Sphenophrya* e *Ancistrocoma* foram observadas nas ostras do tratamento CM. Nenhum patógeno que cause danos significativos à espécie e ao cultivo de *Crassostrea gigas* foi observado.

Palavras-chave: *Crassostrea gigas*, ostra, manejo, HSP70, THC.

ABSTRACT

In aquaculture, the stress caused by the handling in cultivation may impair the production of marine bivalve mollusks, resulting in animal immunological depression and possible occurrence of deaths. In order to gather data that would indicate the effects of farm handling on the immunological aspects, histopathology, and survival of *Crassostrea gigas* oysters (Thunberg, 1793), collections were conducted in the aquaculture site at the Marine Mollusk Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina) in Ponta do Sambaqui, Florianópolis / SC, Brazil, from December 2010 to March 2011, and from June to September 2011. Two treatments were thus analyzed: with no handling (SM, sem manejo) and with handling (CM, com manejo), which consisted of the water spraying of farm net cages and oysters. Every month, animals were collected from both treatments and pools of hemolymph were formed for the analysis of the expression of heat shock protein - HSP70 and for the total haemocyte count - THC. Slides were also prepared for histopathological analysis. Survival values were statistically equal for CM and SM oysters. Oyster THC was not affected by the handling, but it was affected by water temperature, where the highest count of hemocytes occurred in the summer months. Relative quantification in the expression of HSP70 protein was also higher for CM oysters. Higher prevalence of *Sphenophrya*-like and *Ancistrocoma*-like protozoae were observed in CM oysters. No pathogen that could cause harm to the species and to the farm of *Crassostrea gigas* was observed.

Keywords: *Crassostrea gigas*, oyster, farm handling, HSP70, THC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de ostras <i>Crassostrea gigas</i> cultivadas no Estado de Santa Catarina, em toneladas, nos anos de 1991 a 2010.....	22
Artigo Científico	
Figura 1. Temperatura e salinidade da água do mar da Praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis/SC, durante o período de estudo.	38
Figura 2. Número total de ostras vivas e mortas, durante o período de verão.....	42
Figura 3. Valores de THC - contagem total de hemócitos (céls x mL ⁻¹ x 10 ⁶) nos tratamentos CM e SM em ostras <i>Crassostrea gigas</i> cultivadas em Florianópolis.	43
Figura 4. Valores mensais de THC - contagem total de hemócitos (céls x mL ⁻¹ x 10 ⁶) na hemolinfa de ostras <i>Crassostrea gigas</i> cultivadas em Florianópolis.	43
Figura 5. Expressão relativa da proteína HSP70 nas ostras <i>Crassostrea gigas</i> submetidas aos tratamentos CM e SM.	45
Figura 6. Alterações e patógenos encontrados na ostra <i>Crassostrea gigas</i>	46
Figura 7. Alterações e patógenos encontrados na ostra <i>Crassostrea gigas</i>	47
Figura 8. Número de ostras <i>Crassostrea gigas</i> infectadas pelos ciliados <i>Sphenophrya-like</i> e <i>Ancistrocoma-like</i> durante o período de estudo.....	48
Figura 9. Prevalências mensais (%) dos ciliados <i>Sphenophrya-like</i> e <i>Ancistrocoma-like</i> em ostras <i>Crassostrea gigas</i>	48

LISTA DE TABELAS

Artigo científico

Tabela 1. Sequências iniciadoras (*primers*) usados para o qPCR 39

Tabela 2. Valores de altura dos animais utilizados no experimento.
Valores de média (cm) \pm desvio padrão..... 41

Tabela 3. Sobrevivência das ostras *Crassostrea gigas* submetidas aos tratamentos CM e SM no período de verão..... 42

Tabela 4. Níveis de expressão relativa da proteína HSP70 nas ostras manejadas durante o período de estudo..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS

CM – com manejo

cDNA – DNA complementar

HSP – do inglês *heat shock protein* – proteínas de choque térmico

qPCR – do inglês *quantitative polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase em tempo real.

SM – sem manejo

THC – Contagem total de hemócitos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
Artigo científico	
1. Introdução.....	34
2. Materiais e Métodos	36
3. Resultados	40
3.1. Parâmetros físico - químicos.....	41
3.2. Biometrias	40
3.3. Sobrevivência.....	42
3.4. Contagem total de hemócitos	44
3.5. Quantificação dos níveis de transcritos da HSP70.....	45
3.6. Histopatologia	41
4. Discussão.....	51
5. Referências Bibliográficas	55
Agradecimentos.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	62

INTRODUÇÃO

O termo aquicultura faz referência a todas as atividades cujo objetivo é o desenvolvimento, crescimento e comercialização de organismos aquáticos, sejam eles cultivados em água doce, salobra ou salgada (PILLAY; KUTT, 2005). Nesse processo estão incluídas várias etapas para garantir a reprodução, o crescimento e a engorda dos animais, desde os primeiros estágios de vida até a fase adulta. Algas, peixes, crustáceos e moluscos constituem os grandes grupos de maior interesse para o cultivo aquícola.

Em termos mundiais, a aquicultura vem crescendo, tornando-se assim um setor importante na produção de alimentos altamente protéicos. A produção global relatada de peixes e outros animais aquáticos para o consumo humano, incluindo crustáceos e moluscos, alcançou 52,5 milhões de toneladas em 2008, sendo as ostras os bivalves produzidos em maiores porcentagens: 31,8% (FAO, 2010). Ainda no âmbito da aquicultura mundial, a América Latina e a região do Caribe mostraram uma média de crescimento anual de 22%, sendo que a produção de moluscos ocupa a segunda posição, com 14,1 milhões de toneladas, sendo precedida pela piscicultura de água doce (FAO, 2008). Quanto ao cultivo de moluscos bivalves, a espécie que domina a produção mundial é a ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), chegando a valores de 648.574 toneladas no ano de 2009 (FAO, 2009).

Crassostrea gigas é uma espécie de ostra de alto valor protéico e comercial. Tem se adaptado a diferentes litorais no mundo e parece ser menos vulnerável a doenças e predadores. Devido ao acelerado ritmo de crescimento e facilidades de cultivo, no século 20 a espécie foi introduzida em diversas partes do mundo, incluindo Estados Unidos, Chile, Canadá, França, Espanha, Escócia, Inglaterra, entre outros (DORE, 1991). No Brasil, a espécie foi introduzida na década de 70, sendo os primeiros exemplares importados da Grã – Bretanha pelo Instituto de Pesquisas da Marinha para a realização de cultivos experimentais no Estado do Rio de Janeiro (POLI, 2004).

No Estado de Santa Catarina, a introdução da ostra japonesa ocorreu nos anos 80. Através de parceria entre os produtores e a Universidade Federal de Santa Catarina, o cultivo da espécie foi se especializando. Hoje, o Estado é responsável pela produção de 95% da espécie no País, chegando a valores de 1.908 toneladas no ano de 2010 (Figura 1), sendo Florianópolis o município que mais contribuiu para a

produção total, representando um total de 1.477 toneladas, que representa 77,4% da produção estadual (EPAGRI, 2011). Por isso, Florianópolis é chamada “capital nacional da ostra”. A produção desses organismos é uma atividade de grande envolvimento social, principalmente de pescadores artesanais que encontraram na ostreicultura uma fonte de renda e trabalho, face à pesca em colapso.

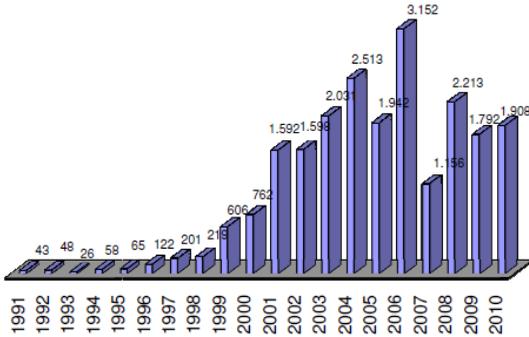


Figura 1. Produção de ostras *Crassostrea gigas* cultivadas no Estado de Santa Catarina, em toneladas, nos anos de 1991 a 2010 (EPAGRI, 2011).

A elevada produção de bivalves a nível mundial, está relacionada com o aparecimento de enfermidades com distintos graus de severidade que, em alguns casos, tem sido associado com episódios de mortalidade (PORTELA, 2008). A mortalidade de verão, fenômeno detectado pela primeira vez no Japão no ano de 1940 e de ocorrência mundial para *Crassostrea gigas* (CHENEY; MACDONALD; ELSTON, 2000), tem causado grandes perdas no cultivo em diversos países, afetando animais jovens e adultos sem sinais clínicos evidentes (GOULLETQUER et al., 1998). Estudos vêm sendo feitos ao longo dos anos e todos sugerem que a mortalidade de verão seja uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores extrínsecos, o mais importante parece ser a elevação da temperatura da água, que associada com fatores intrínsecos como a gametogênese e a desova, debilitam o animal. Alguns outros fatores extrínsecos que podem auxiliar no estresse do animal, são a presença de patógenos e algumas práticas de cultivo. Na França, desde 1991, sementes de *C. gigas* apresentam taxas de mortalidade de 60–100% durante o verão (BERTHELIN; KELLNER; MATHIEU, 2000). Na Alemanha, Watermann et al. (2008) relataram perdas de 60% de

ostras *Crassostrea gigas* provenientes de bancos naturais, em que todos os tamanhos e idades foram afetados.

No Brasil, a mortalidade de verão no cultivo de ostras foi observada em Santa Catarina, nos anos 90 (POLI, 1992). Até hoje, os ostreicultores catarinenses relatam perdas de ostras para o período do verão (janeiro a março), quando as temperaturas da água do mar são mais elevadas. Contudo, ainda não existe um estudo apresentando a real ocorrência desta mortalidade, assim como sua intensidade e causa. A falta de manejo adequado nesse período de maior comercialização das ostras é apontada como a principal e talvez única causa das mortalidades. A ausência de corretas práticas de cultivo, em relação à densidade de ostras por lanternas, espaçamento entre espinhéis e lanternas e limpeza das estruturas envolvidas na ostreicultura, juntamente com perturbações ambientais, podem afetar o estado fisiológico e imunológico dos organismos gerando um estresse e, como consequência, induzindo suscetibilidade a doenças, favorecendo o estabelecimento de enfermidades.

Para as ostras cultivadas no litoral do município de Florianópolis, as dúvidas também existem quanto à ocorrência dessa mortalidade de verão, sua intensidade e causas. A pesquisa para auxiliar nesse entendimento deve, também, se preocupar com questões relacionadas ao manejo no cultivo, além de acompanhamento de alguns parâmetros imunológicos e da saúde das ostras de forma geral.

O Manual da BMLP (2003) – *Brazilian Mariculture Linkage Program* – cita que práticas de manejo corretas devem ser empregadas durante o cultivo, a fim de evitar o acúmulo de material incrustante nas ostras, tendo-se cuidado, principalmente, com a presença de organismos vivos indesejáveis e ainda com o acúmulo de lodo na malha, o que pode vir a impedir a circulação da água e favorecer o ataque de predadores e de organismos incrustantes, impedindo o desenvolvimento das ostras, podendo levá-las à morte. Nas fazendas de cultivo, para uma limpeza efetiva das ostras e das lanternas de cultivo são utilizadas as bombas de limpeza, um hidro-compressor ou moto-bomba. As lanternas são deixadas ao ar, para secagem, eliminação e morte dos organismos indesejáveis, facilitando em seguida a raspagem.

A grande maioria dos parasitos conhecidos como causadores de morbidade e mortalidade em bivalves são os pertencentes ao grupo das bactérias e ao dos protozoários (MAGALHÃES et al., 2000; Da SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2002; FRIEDMAN et al., 2005; MAGALHÃES; FERREIRA, 2006 e WATERMANN et al., 2008). Em

muitos casos, as doenças por eles causadas provocam perdas recorrentes, que podem vir a dizimar os estoques naturais e estancar a indústria da produção, como foi o caso de *Ostrea edulis* na Europa, afetada por duas doenças: a marceliose e a bonamiose, causadas pelos protozoários, *Marteilia refringens* e *Bonamia ostreae*, respectivamente. Outro protozoário que também causa mortalidades massiva em diferentes espécies de bivalves é o *Perkinsus*, de notificação obrigatória à OIE – Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2012).

No Brasil, a pesquisa na área de patologia de bivalves é ainda recente. São poucos os grupos de pesquisa no País que estudam esse tema, sendo realizados estudos principalmente em Santa Catarina, Bahia, Paraíba, Ceará e Pará.

Das publicações que revisam as enfermidades encontradas até o momento na ostra *Crassostrea gigas* no Estado de Santa Catarina, como as de Sabry e Magalhães (2005) e Pontinha (2009), há citações de protozoários, como os dos gêneros *Ancistocroma* e *Sphenophrya* e os da família Trichodinidae, todos em baixa patogenicidade e leve intensidade de infecção. Entre os metazoários infestantes de *C. gigas*, Ibbotson (2002) observou prevalências do anelídeo perfurante *Polydora* sp. (Polychaeta: Spionidae) em todos os meses amostrados, chegando a 100% no período de águas mais frias. Os trabalhos de Sabry e Magalhães (2005) e Pontinha (2009) registraram a prevalência de 100% de *Polydora websteri* nas ostras durante a maior parte do ano, o que compromete a qualidade do produto final, ainda que não cause mortalidade nos moluscos.

Entre os protozoários de notificação obrigatória, Sabry et al. (2009) relataram pela primeira vez no litoral cearense, a presença do protozoário patogênico do gênero *Perkinsus*, causador da enfermidade “Perkinsiose”, na ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) no Estuário do Rio Pacoti. Este foi primeiro registro da ocorrência de um parasito do gênero *Perkinsus* em bivalves no Brasil. Estudos recentes realizados por Da Silva et al. (2012) identificaram como sendo a espécie *Perkinsus marinus*. Na ostra nativa norte americana *C. virginica*, a espécie *P. marinus* causou mortalidades superiores a 95% (BOWER et al., 1994). É um protozoário que infesta todos os tecidos da ostra, onde só a observação microscópica dos tecidos revela o parasita. *Crassostrea gigas* parece ser mais resistente a esse patógeno, mas possui distribuição assinalada para a costa leste dos Estados Unidos, Jamaica, Porto Rico, Cuba (MAGALHÃES et al., 2000). Essa doença está relacionada a águas do mar com temperaturas superiores a 20°C, sendo um problema

potencial para os moluscos no litoral brasileiro. Por isso é necessário um constante monitoramento desse protozoário no litoral do País.

Para a detecção de patógenos, é importante o estudo microscópico dos tecidos dos animais, através de técnicas histológicas, usadas para estudar estruturas da célula e dos tecidos sob microscopia de luz. As preparações do tecido a ser analisado incluem diferentes passos, com inclusão em parafina, cortes em micrótomo e coloração HE (hematoxilina-eosina), sendo as mais utilizadas e recomendadas (MAGALHÃES et al., 2000 e OIE, 2009).

Sistema imunológico das ostras

Segundo Abbas; Lichtman e Pillai (2010), imunidade é definida como uma reação frente a substâncias exógenas, vivas ou inertes, entre as quais se inclui tanto microorganismos e macromoléculas como proteínas ou lipopolissacarídeos. Para o reconhecimento e imobilização de microorganismos e parasitas, os bivalves necessitam de um mecanismo de defesa imediato e eficiente.

Diferente dos vertebrados, as ostras não possuem um sistema imune adaptativo, com memória imunológica e produção de moléculas de reconhecimento altamente específicas como os anticorpos. A imunidade nos moluscos bivalves, assim como nos demais invertebrados, é conferida tanto pelas barreiras físicas e químicas protetoras, como a concha e a produção de muco, como também, por células de defesa, denominadas hemócitos e por moléculas líticas no plasma (FENG, 1988; ROCH, 1999; PORTELA, 2008).

O sistema de defesa é dito como inato ou natural devido à presença de moléculas de defesa antes mesmo do contato com o patógeno. É um sistema inespecífico, pois não tem a capacidade de discriminar diferenças entre agentes estranhos, fazendo com que a resposta imune seja exatamente igual a cada reinfecção. Em todos os animais o sistema inato age de forma a proteger o organismo buscando manter a homeostasia corpórea.

Nos bivalves, devido ao seu sistema circulatório aberto, todos os tecidos estão em maior contato com o fluido de defesa – a hemolinfa - que contém a fração líquida contendo diferentes fatores humorais e fração celular de defesa composta pelos hemócitos – células envolvidas em diversas funções, incluindo respiração e nutrição, resposta imune e resposta ao estresse (SONG et al., 2011).

Os hemócitos são responsáveis pelas reações imunológicas e agem fagocitando partículas, além de agirem secretando moléculas microbicidas como os peptídeos antimicrobianos (PAM) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Entre os fatores humorais do sistema imunológico desses animais, estão as proteínas que podem estar dissolvidas na hemolinfa, entre elas as proteínas de choque térmico (HSPs), enzimas hidrolíticas como a lisozima e aglutininas ou lectinas (FENG, 1988).

O sucesso na resposta de defesa depende da quantidade de hemócitos e no tipo celular envolvido no processo. Sabendo que fatores bióticos e abióticos podem influenciar o mecanismo de defesa feito por essas células, o monitoramento do número de hemócitos circulantes tem sido considerado uma resposta aos estressores presentes no ambiente (PEREZ; FONTANETTI, 2011). Parry e Pipe (2004), através da contagem do número de hemócitos (THC), investigaram os efeitos do cobre no sistema imune do mexilhão *Mytilus edulis*, observando um aumento do número de hemócitos circulantes nos animais expostos a salinidade de 0,005ppm e temperatura de 15°C.

Fisher; Oliver e Edwards (1996) observaram uma diminuição na THC da ostra *Crassostrea virginica* em períodos de temperaturas mais baixas. Barth (2002), estudando a ostra nativa *C. rhizophorae* em Santa Catarina, observou valores mais elevados de THC nos meses de verão.

Lacoste et al.(2002) investigaram a consequência de perturbações mecânicas no sistema imunológico de ostras *C. gigas*, simulando práticas de manejo aplicadas nos cultivos. O experimento constou na agitação dos animais em um agitador, durante 15 minutos. O THC, a atividade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio foram mensurados antes, durante e após a perturbação mecânica. Os resultados obtidos mostraram que houve decréscimo no número de hemócitos e inibição das outras funções imunes durante o estresse.

Proteínas de choque térmico

As células de vertebrados e invertebrados são capazes de sintetizar proteínas, conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs: do inglês *heat shock proteins*), originalmente caracterizadas por sua indução pelo calor (FEDER; HOFMANN, 1999; PORTELA, 2008 e FABRI; VALBONESI; FRANZELLITTI, 2008).

As HSPs são codificadas por um pequeno grupo de genes altamente conservados. Essas proteínas podem ser agrupadas em

isoformas constitutivas e isoformas induzíveis. As proteínas ditas HSC (do inglês *heat shock cognate*) representam a forma constitutiva; essas são expressas em condições fisiológicas e agem como chaperonas, sendo responsáveis pelo enovelamento e manutenção da estrutura de outras proteínas (FEDER; HOFMANN, 1999).

As formas induzíveis, referidas como HSP, são sintetizadas por células sob condições perturbadoras e mostram um papel na defesa celular (FABBRI; VALBONESI; FRANZELLITTI, 2008), evitando a desnaturação protéica. Entre os fatores perturbadores podem-se citar extremos de temperatura, depleção de energia celular, concentrações extremas de íons, gases, substâncias tóxicas, metais pesados e agentes infecciosos (FEDER; HOFMANN, 1999 e ENCOMIO; CHU, 2005). Por esse motivo, sua expressão é utilizada como marcador em processos de estresse e contaminação (PORTE et al., 2001). As HSPs normalmente perfazem aproximadamente 5% do total de proteínas intracelulares. No entanto, sob condições de estresse, seus níveis podem ultrapassar 15% (SRIVASTAV, 2002).

A classificação das HSPs é dada em função de seu peso molecular, podendo variar entre 15 e 110kDa (SONG et al., 2011). Sequências múltiplas de isoformas de HSP70 foram analisadas principalmente para as ostras *Ostrea edulis* e *Crassostrea gigas* e para o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* como marcadores de estresse e contaminações (SNYDER; GIRVETZ; MULDER, 2001; IVANINA; TAYLOR; SOKOLOVA, 2009 e JACKSON; UHLINGER; CLEGG, 2011).

A modulação protéica também está relacionada com processos imunes já que sua expressão foi incrementada quando os hemócitos de *M. galloprovincialis* foram expostos à bactéria *Vibrio anguillarum* (CELLURA et al., 2007). Em ostras *C. virginica* infectada por *Perkinsus marinus*, foi observada uma maior expressão de HSP69. As ostras preexpostas a estresse térmico subletal (40°C durante 1h) e posteriormente desafiadas com *P. marinus*, tiveram maior sobrevivência, indicando que a superexpressão HSP, devido ao calor, fornece tolerabilidade a um estímulo de estresse adicional, no caso, *P. marinus* (ENCOMIO; CHU, 2007).

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o de contribuir para o conhecimento do efeito do manejo na sobrevivência, patologia e imunologia de ostras *Crassostrea gigas* cultivadas na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, SC.

Objetivos específicos

- Avaliar a influência do manejo de cultivo na sobrevivência da ostra *Crassostrea gigas* no período de verão;
- Avaliar a influência do manejo de cultivo sobre alguns parâmetros imunológicos, como na contagem total de hemócitos e na expressão da proteína de choque térmico HSP70, na ostra *C. gigas* no período de verão e de inverno;
- Avaliar a influência do manejo de cultivo na ocorrência de patógenos na ostra *C. gigas* no período de verão e de inverno.

Efeito do manejo sobre a sobrevivência, ocorrência de patógenos e respostas imune da ostra *Crassostrea gigas* cultivada no Sul do Brasil

Celene da Silva Ivachuk^{1,*}, Simone Sühnel¹, Juliana Moser¹, Aimê Rachel Magenta Magalhães¹

Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola - NEPAq - Departamento de Aquicultura/CCA - Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga 1346, Florianópolis/SC/Brasil. CEP 88034-001.
E-mail para correspondência: celene.ivachuk@gmail.com

Artigo científico preparado segundo as normas do periódico *Disease of Aquatic Organisms*

Resumo

Na aquicultura, o estresse causado por práticas de manejo pode comprometer a produção dos animais aquáticos, deprimindo imunologicamente os indivíduos e podendo causar mortalidade. Com o objetivo de gerar informações sobre a influência do manejo sobre os aspectos imunológicos, histopatologia e a sobrevivência das ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivadas, foi conduzido experimentos na área aquícola do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, na Praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis/SC, Sul do Brasil, no período de dezembro de 2010 a março de 2011 e no período de junho a setembro de 2011. As ostras foram submetidas a dois tratamentos: com manejo (CM) e sem manejo (SM). O manejo constou no jateamento mensal das lanternas de cultivo e dos animais com água doce. Foram coletados animais mensalmente e formados pools de hemolinfa, para análise da expressão da proteína de choque térmico – HSP70 e para a contagem total de hemócitos – THC. Também foram preparadas lâminas para análises histopatológicas e calculada a sobrevivência dos animais para o período de verão. O manejo não interferiu na sobrevivência das ostras. O THC das ostras não foi influenciado pelo manejo e sim pela temperatura da água, com os maiores valores de THC ocorrendo no verão. A expressão da HSP70 teve valores relativos maiores nas ostras CM em relação às ostras SM. Nos exames histopatológicos foram observados quatro diferentes protozoários, entre os quais os do tipo *Sphenophyra* e *Ancistrocoma*, encontrados com maior prevalência nas ostras CM. Nenhum dos protozoários encontrados foi considerado patógeno severo.

Palavras-chave: *Crassostrea gigas*, ostra, manejo, HSP70, THC.

Effect of handling practices on survival, occurrence of pathogens and immune responses of the oyster *Crassostrea gigas* cultivated in Southern Brazil

Abstract

In aquaculture, cultivation handling may cause stress and impair the production of aquatic animals, resulting in animal immunological depression and possible occurrence of deaths. In order to gather data that would indicate the effects of farm handling on the immunological aspects, histopathology, and survival of *Crassostrea gigas* oysters (Thunberg, 1793), collections were conducted in the aquaculture site at the Marine Mollusk Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina) in Ponta do Sambaqui, Florianópolis / SC, South of Brazil, from December 2010 to March 2011, and from June to September 2011. The oysters were subjected to two treatments: with no handling (SM, sem manejo) and with handling (CM, com manejo) The treatment consisted in the monthly water spraying of farm net cages and oysters with fresh water. Every month, animals were collected and pools of hemolymph were formed for the analysis of the expression of heat shock protein - HSP70 and for the total haemocyte count - THC. Slides were also prepared for histopathological analysis and animal survival was calculated. The survival of animals was the same for both treatments. Oysters THC was not affected by farm handling. It was only affected by water temperature, and in the summer months the oysters had higher THC values. The expression of HSP70 had increased relative values for CM oysters compared to SM oysters. Histopathology results indicated the presence of four protozoans, none of them pathogenic. Higher prevalence of *Sphenophyra*-like and *Ancistrocoma*-like type protozoae were observed in CM oysters. None of protozoans found was considered pathogen severe.

Keywords: *Crassostrea gigas*, oyster, farm handling, HSP70, THC.

1. Introdução

A ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* foi introduzida no Brasil no início da década de 70 (Poli 2004). Desde então, a espécie tem um papel importante na indústria aquícola, sendo um dos moluscos bivalves mais produzidos no País. Em 2010, o Estado de Santa Catarina, maior produtor da espécie, atingiu a produção de 1.908 toneladas, sendo o Município de Florianópolis responsável pela produção de 77,4% desse valor (Epagri 2011).

Na década de 90, Poli (1992) relatou a ocorrência de mortalidades massivas nos cultivos de ostras no Estado de Santa Catarina e, desde então, os ostreicultores catarinenses relatam perdas de ostras no período do verão (janeiro a março), quando as temperaturas da água do mar estão mais elevadas. A mortalidade massiva de verão, fenômeno detectado pela primeira vez no Japão em 1940 e de ocorrência mundial para *Crassostrea gigas*, tem causado grandes perdas no cultivo em diversos países, afetando animais jovens e adultos (Cheney et al. 2000). A combinação de fatores abióticos e bióticos – fisiológicos e patológicos - tem sido proposta para identificar as possíveis causas dessa mortalidade (Gouletquer et al. 1998, Friedman et al. 2005, Soletchnik et al. 2006, Garnier et al. 2007).

Os parasitos são citados como causadores de morbidade e mortalidade em bivalves, principalmente os pertencentes ao grupo das bactérias e ao dos protozoários (Friedman et al. 2005, Magalhães & Ferreira 2006, Watermann et al. 2008). Em muitos casos, as doenças por eles causadas provocam perdas recorrentes, que podem vir a dizimar os estoques naturais e estancar a indústria da produção.

Entre os protozoários que causam mortalidades massivas em diferentes espécies de bivalves, destaca-se o gênero *Perkinsus*, agente causador da perkinsiose, enfermidade de notificação obrigatória à OIE – Organização Internacional de Epizotias.

A perkinsiose teve seu primeiro relato no Brasil recentemente. Sabry et al. (2009) registraram a ocorrência de protozoários do gênero *Perkinsus* em ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* coletadas no Estuário do Rio Pacoti, município de Fortaleza/CE, nordeste do Brasil. Os mesmos autores, nesse trabalho, informam que não foi encontrado esse organismo em ostras *C. gigas* cultivadas e em ostras nativas do município de Florianópolis/SC. Todavia, essa ocorrência preocupa e o acompanhamento da saúde das ostras tem sido contínuo no litoral de

Santa Catarina. Estudos realizados por Da Silva et al. (2012), identificaram as espécies de ocorrência e entre elas a espécie *Perkinsus marinus*.

Entre os fatores abióticos que podem vir a comprometer a saúde dos animais e causar mortalidades, são relatados o estresse causado pelas práticas de cultivo e estresses causados por mudanças nos fatores ambientais no cultivo (Carballal et al. 1998, Lacoste et al. 2002, Perez & Fontanetti 2011). Para manter a homeostasia do corpo nessas situações e para o reconhecimento e imobilização de microorganismos e parasitos, os bivalves necessitam de um mecanismo imediato e eficiente de defesa. Células imunológicas, conhecidas como hemócitos, são responsáveis pela manutenção corpórea. Essas células circulam na hemolinfa, fagocitando partículas estranhas, secretando moléculas microbicidas como os peptídeos antimicrobianos (PAM) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Entre os fatores humorais do sistema imunológico desses animais, estão as proteínas que podem se encontrar dissolvidas na hemolinfa, entre elas as proteínas de choque térmico (HSPs) e enzimas hidrolíticas como a lisozima e aglutininas ou lectinas (Feng 1988, Song et al. 2011).

Entre as proteínas de choque térmico, a HSP70 tem sido estudada em diferentes bivalves (Boutet et al. 2003, Piano et al. 2004, Lesser et al. 2010). As HSPs são codificadas por um pequeno grupo de genes altamente conservados que aumentam sua transcrição durante o período de perturbações, como por exemplo, extremos de temperatura, estresse oxidativo, agentes químicos, metais pesados e também agentes infecciosos (Encomio & Chu 2007, 2005, Fabbri et al. 2008, Farcy et al. 2009), por esse motivo sua expressão é utilizada como marcador em processos de estresse e contaminação (Porte et al. 2001, Fabbri et al. 2008). Segundo Cellura et al. (2007), a modulação protéica também esteve relacionada com processos imunes no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, pois sua expressão foi incrementada quando os hemócitos foram expostos à bactéria *Vibrio anguillarum*.

Na ausência de estudo apresentando a real ocorrência da mortalidade relatada pelos produtores de ostras do litoral de Florianópolis, assim como sua intensidade e causas, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito causado pelo emprego de práticas de cultivo nas ostras. Avaliou-se a sobrevivência, a ocorrência de patógenos e o estado imunológico das ostras *Crassostrea gigas* cultivadas no Município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina.

2. Materiais e Métodos

Foram utilizadas ostras *Crassostrea gigas* adultas, provenientes de sementes produzidas em laboratório. Os animais foram mantidos em lanternas japonesas no sistema suspenso do tipo espinhel, na área de cultivo experimental do LMM - Laboratório de Moluscos Marinhos/UFSC, localizado no litoral Norte da Ilha de Santa Catarina, na Praia da Ponta do Sambaquí (27°29'22"S – 48°32'15"W).

Foi avaliada a influência do manejo nas respostas dos animais nos seguintes parâmetros: i) imunológicos: nível de transcritos do gene da proteína HSP70 e contagem total de hemócitos (THC); ii) ocorrência de patógenos e iii) sobrevivência dos animais. Para a avaliação desses parâmetros foram realizados experimentos em dois períodos: dezembro/2010 a março/2011 (verão) e junho/2011 a setembro/2011 (inverno). Em ambos os experimentos foram analisados dois tratamentos: o tratamento “com manejo” (CM) e o tratamento “sem manejo” (SM). No tratamento CM, mensalmente as lanternas foram retiradas do mar, lavadas com jatos de água doce e retornadas para o mar. No tratamento SM não foi realizado manejo nas lanternas.

Em ambos os experimentos, foram realizadas amostragens mensais de ostras, com 20 animais por tratamento (CM e SM), incluindo a amostragem inicial chamada de T0, totalizando 280 animais. Para cada amostragem foi realizada a reposição dos animais retirados, mantendo a mesma densidade durante todo o período experimental.

Para o experimento dos meses de verão foram utilizadas 3 lanternas definitivas de quatro andares, mantendo uma densidade de 20 indivíduos/andar e para o experimento dos meses de inverno, 2 lanternas com 30 indivíduos/andar.

Paralelamente às amostragens, a temperatura da água do mar foi mensurada diariamente com um datalogger da marca Tidbit e, a salinidade, foi registrada semanalmente com o uso de refratômetro.

2.1 Sobrevivência

A sobrevivência dos animais, nos tratamentos CM e SM, foi avaliada ao final do período de verão. A porcentagem de sobrevivência foi estimada como sendo o número de ostras vivas da lanterna de coleta ao final do experimento, dividido pelo número total de ostras colocadas no início do experimento e multiplicado por 100.

Para verificar diferenças na sobrevivência das ostras entre os dois tratamentos (CM e SM), os dados foram plotados em tabela de contingência no GraphPad Prism e analisados com o teste do qui quadrado, sob um nível de significância de 95%.

2.2 Biometria

Após a coleta mensal de campo, os animais foram levados para o Laboratório de Malacologia Experimental (LAMEX), no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola do Departamento de Aquicultura da UFSC, onde foram mensurados, obtendo-se valores de altura (cm). Essa medida constou na maior distância entre o umbo e a margem ventral das valvas de cada animal, conforme Galtsoff (1964). Foram obtidas médias e desvio padrão dos valores mensais da altura das ostras.

2.3 Parâmetros imunológicos

2.3.1 Extração da hemolinfa

Após a biometria das ostras, com o auxílio de uma lâmina, perfurou-se a valva de cada animal, nas proximidades do músculo adutor, para a retirada da hemolinfa utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa. Alíquotas de hemolinfa de cada indivíduo foram analisadas em microscópio óptico para eliminar amostras com partículas contaminantes, gametas ou pedaços de tecido, que poderiam interferir no resultado dos procedimentos. Os microtubos de polietileno e seringas utilizados foram mantidos em gelo, para evitar a agregação hemocitária nas amostras extraídas. Em cada tratamento amostrado, foram utilizados 4 pools de 5 animais ($n = 4$) para avaliação do nível de transcritos do gene da proteína HSP70 e contagem total de hemócitos (THC).

2.3.2 Contagem total de hemócitos - THC

A contagem total de hemócitos (THC) foi realizada mensalmente nos pools de hemolinfa dos animais. A THC foi estimada para cada pool, utilizando uma câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os resultados do THC foram expressos como número de hemócitos ($\times 10^6$) mL x hemolinfa⁻¹.

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism Software, versão 5.01. Os valores de THC foram submetidos ao teste de normalidade de dados KS. A análise de

variância de duas vias (ANOVA) foi usada para avaliar o efeito do tratamento (CM e SM) e o efeito dos meses amostrados.

2.3.3 Análise e quantificação dos níveis de transcritos da HSP70

A técnica utilizada para a determinação da transcrição da proteína de choque térmico (HSP70) nos pools de hemolinfa submetidos aos dois tratamentos da expressão dos genes foi a PCR quantitativa ou PCR em tempo real (qPCR). Essa técnica é capaz de detectar a presença de poucas cópias gênicas e quantificar exatamente a expressão de um gene.

A extração do RNA total dos hemócitos foi realizada nos pools de hemolinfa com reagente comercial TRIzol (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Ao final da extração as amostras foram ressuspendidas em água *RNase-free*. Para a determinação da concentração e da pureza do RNA extraído foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop, modelo ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a partir da absorbância a 260 nm. O RNA extraído foi tratado para eliminar qualquer vestígio de DNA. Para isso, utilizou-se um buffer juntamente com uma enzima DNase II (SIGMA).

Para síntese do cDNA foi realizada a transcrição reversa utilizando o sistema Omniscript RT Kit (Qiagen) e seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, a partir de 2µg do RNA extraído. As amostras dos pools contendo a reação final foram incubadas em termociclador por 90 min a 37°C para síntese do cDNA. A concentração e a pureza do cDNA foram checadas por espectrofotometria, como descrito anteriormente.

Os níveis dos transcritos da hemolinfa dos animais foram analisados em um termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Corbett Life Science) utilizando o kit QuantiTect SYBR Green qPCR Mix (Qiagen). As reações de 20µL continham 10µL de SYBR Green qPCR Mix 1x, 2µL de sequências iniciadoras - primers, 1µL do cDNA da amostra e 7µL de água *RNase-free*. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: uma desnaturação inicial a 95 °C por 5min, 40 ciclos de 95 °C por 10s, 56 °C por 20s e 72 °C por 10s.

A análise da curva de dissociação – *melting* - dos produtos amplificados foi realizada no final de cada reação de qPCR para confirmar que apenas um produto foi amplificado.

As reações foram realizadas em triplicata, permitindo a detecção de possíveis erros. A análise da eficiência da reação foi feita a partir da qPCR em diferentes concentrações de cDNA (25, 50, 100 e 200ng) para os genes estudados.

Os iniciadores para o gene da HSP70 foram retirados da publicação de Boutet et al. (2003), enquanto os iniciadores específicos para o gene da actina foram desenhados utilizando-se o programa PrimerQuest (Integrated DNA Technology) e foram baseados na sequência de RNAm do gene obtida no banco de dados GenBank (tabela 1).

Os hemócitos dos animais do tratamento SM foram utilizados como grupo controle, tendo um nível de expressão igual a 1. Logo, as ostras CM tiveram seus níveis de expressão comparados com as ostras SM controle do mês analisado

Os dados obtidos foram analisados usando o software REST (QIAGEN), o qual foi usado para determinar diferenças na expressão do gene da HSP 70 em relação à expressão do grupo controle e com o gene normalizador β -actina.

Tabela 1. Sequências iniciadoras (primers) usados para o qPCR.

Primers	Sequência 5'-3'
Hsp 70 forward	GGAATAGATCTTGGAAACCACATA
Hsp 70 reverse	AATGGCGGCTGGACAGCTGC
β-Actin forward	ATGTCCCAGGATTTGCTGACCGT
β-Actin reverse	TCCACATCTGTTGGAAGGTGGACA

2.4 Histopatologia

Após a retirada de hemolinfa, cada uma das 280 ostras estudadas foi aberta através da secção do músculo adutor e retirou-se o corpo do animal da concha. Para a análise histopatológica foi feita uma secção transversal de tecido com aproximadamente 5mm de espessura, contendo brânquias, glândula digestiva, gônada, manto e palpos labiais. Os tecidos foram fixados em solução de Davidson marinho com ácido acético por 48 horas e posteriormente conservados em etanol 70%.

O material foi então submetido ao procedimento padrão de histologia, que incluiu desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram cortados a 5 μ m de espessura e as lâminas foram coradas pelo método Hematoxilina de Harris e Eosina

(HHE) para posterior observação em microscópio de luz para a detecção de patógenos nos tecidos das ostras.

A prevalência dos patógenos foi calculada como o total de ostras afetadas dividido pelo total de ostras coletadas. Foi calculada a prevalência mensal por tratamento no período avaliado, a prevalência mensal total (os dois tratamentos), prevalência total durante o experimento e a prevalência total por tratamento no período avaliado.

Para verificar diferenças na prevalência dos patógenos nas ostras entre os tratamentos e os meses de estudo, os dados foram plotados em tabela de contingência no GraphPad Prism e analisados com o teste do qui quadrado, sob um nível de significância de 95%.

3. Resultados

3.1 Parâmetros físico - químicos

Durante o período de experimento, a temperatura média da água do mar foi de $26,2 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ no verão e de $17,6 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ no inverno. A salinidade média foi de $32,8 \pm 2,7\text{‰}$ no verão e $34,2 \pm 2,9\text{‰}$ no inverno (Fig. 1). Foram observadas duas estações definidas na região: inverno com baixas temperaturas e maiores valores de salinidade e verão, com temperaturas elevadas e menor salinidade.

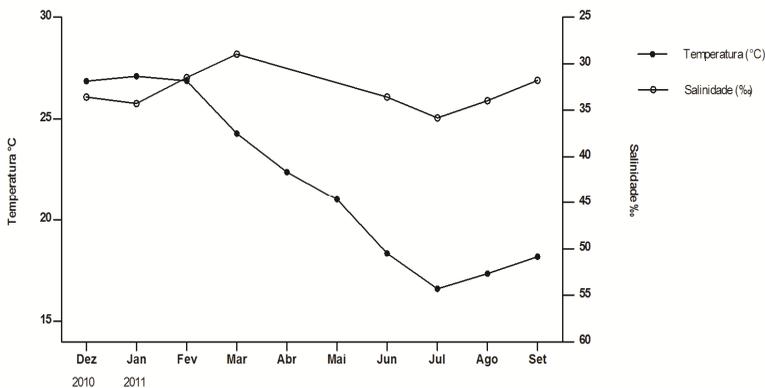


Fig. 1. Temperatura e salinidade da água do mar da Praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis/SC, durante o período de estudo.

3.2 Biometrias

Os valores médios de altura das ostras utilizadas durante o experimento foram de $9,3 \pm 0,47$ cm para as ostras no verão e $9,6 \pm 0,71$ cm no inverno (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de altura das ostras *Crassostrea gigas* utilizadas no experimento. Valores de média (cm) \pm desvio padrão.

	CM	SM
Janeiro	$8,8 \pm 2,16$	$8,9 \pm 1,18$
Fevereiro	$9,1 \pm 1,07$	$9,3 \pm 0,78$
Março	$9,7 \pm 1,86$	$10 \pm 1,31$
Julho	$9,2 \pm 0,81$	$9,5 \pm 1,08$
Agosto	$9,1 \pm 1,10$	$11 \pm 2,40$
Setembro	$9,2 \pm 1,41$	$9,7 \pm 1,61$

3.3 Sobrevivência

A sobrevivência das ostras no período de verão foi estatisticamente semelhante entre os dois tratamentos ($p = 0,0962$), tendo as ostras CM sobrevivência média de 52,4% e, as ostras SM, 60,1% ao final do experimento. Na tabela 3 estão expostos os valores encontrados no final do experimento (mês de março) quando foram feitas as contagens de ostras mortas e vivas nas lanternas de cultivo. Pode-se observar a ocorrência de expressiva mortalidade. A figura 2 apresenta o número de ostras vivas e mortas no período do verão.

Tabela 3. Sobrevivência das ostras *Crassostrea gigas* submetidas aos tratamentos CM (com manejo) e SM (sem manejo) no período de verão.

Lanternas	Ostras vivas		Ostras mortas		Total inicial		Sobrevivência (%)	
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
1	51	45	28	35	79	80	64,5	56,2
2	45	49	35	31	80	80	56,2	61,2
3	47	31	32	47	79	78	59,5	39,7

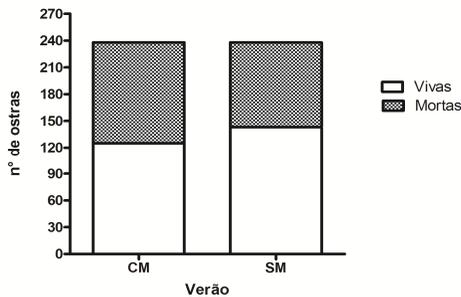


Fig. 2. Número total de ostras vivas e mortas, durante o período de verão.

3.4 Contagem total de hemócitos (THC)

A contagem no número de hemócitos nos *pools* de hemolinfa dos animais variou de $1,08 \times 10^6$ a $6,16 \times 10^6$.

Os valores médios no número dessas células dos animais submetidos ao tratamento CM foram de $2,71 \times 10^6$ e, nos animais do tratamento SM, $2,49 \times 10^6$. Quando comparados os tratamentos CM e SM, o número total de hemócitos foi estatisticamente semelhante ($p = 0,3504$). Este resultado pode ser melhor visualizado na figura 3.

Quando analisou-se apenas os meses de experimento, sem levar em consideração o tratamento, pode-se observar uma relação temporal no aumento do número dessas células, tendo sido o número de hemócitos maior nos meses de verão em relação aos meses de inverno ($p = 0,0012$) (Fig. 4).

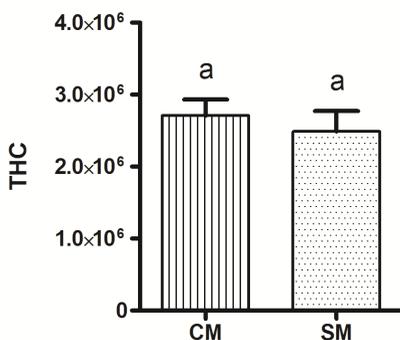


Fig.3. Valores de THC - contagem total de hemócitos ($\text{cél/s} \times \text{mL}^{-1} \times 10^6$) nos tratamentos CM (com manejo) e SM (sem manejo) em ostras *Crassostrea gigas* cultivadas em Florianópolis. Mesma letra (a) significa não haver diferença significativa.

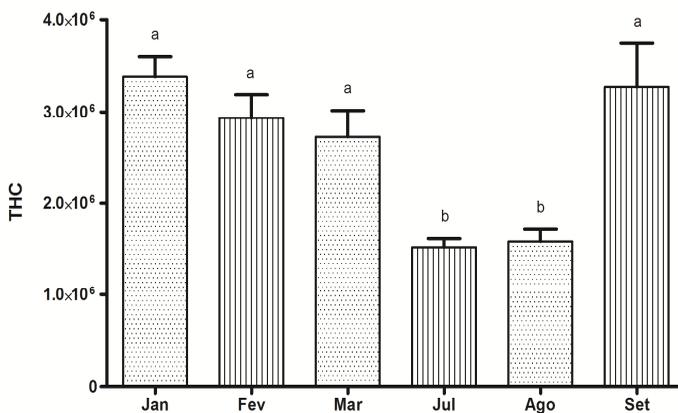


Fig. 4. Valores mensais de THC - contagem total de hemócitos ($\text{cél/s} \times \text{mL}^{-1} \times 10^6$) na hemolinfa de ostras *Crassostrea gigas* cultivadas em Florianópolis. Letras diferentes significam diferenças estatísticas.

3.5. Quantificação dos níveis de transcritos da HSP70

A quantificação de HSP70 pelo método do qPCR analisou os níveis de transcritos da proteína nos tratamentos CM e SM.

Tendo como base de comparação o nível de expressão de HSP70 igual a 1 do grupo controle, observou-se que os valores dos níveis de expressão da proteína nas ostras CM tiveram quantificação aumentada (UP) em relação ao grupo controle nos meses de janeiro, fevereiro, julho e agosto. Nos meses de março e setembro os níveis da proteína nas ostras CM foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (DOWN) (Fig.5).

Os níveis de expressão da proteína nas ostras CM podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Níveis de expressão relativa da proteína HSP70 nas ostras manejadas (CM) durante o período de estudo.

	Expressão	Valores de p	Resultados
Jan CM	4,317	0,001	UP
Fev CM	4,912	0,029	UP
Mar CM	3,464	0,104	DOWN
Jul CM	1,696	0,047	UP
Ago CM	4,461	0,000	UP
Set CM	1,156	0,686	DOWN

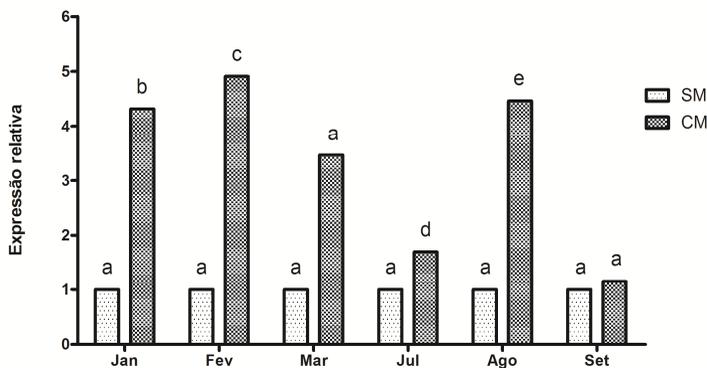


Fig. 5. Expressão relativa da proteína HSP70 nas ostras *Crassostrea gigas*, submetidas aos tratamentos CM (com manejo) e SM (sem manejo). Letras diferentes significam diferenças estatísticas.

3.6 Histopatologia

O exame histopatológico nas ostras submetidas aos tratamentos revelou a presença de três protozoários e de uma alteração celular provocada por vírus.

Hipertrofia do gameta

Células hipertrofiadas basófilas foram observadas no lúmen dos folículos dos indivíduos (Fig. 6A). Essas células mediam em média $15\mu\text{m}$ ($N = 3$) de diâmetro, estando presentes apenas em indivíduos com as gônadas vazias. Em nenhuma ostra foram observados danos no tecido conjuntivo circundante.

A prevalência dessa condição foi baixa: 1,25%. Apenas um indivíduo com essa alteração no mês de março/11 e dois indivíduos no mês de setembro/11.

Protozoário não identificado

Um protozoário não identificado foi observado em prevalência de 2,1%. Apenas cinco indivíduos continham o protozoário, sendo dois observados na coleta T0 e, o restante, nos outros meses de verão.

A forma mais abundante desse protozoário apareceu como vacúolos, semelhantes a cistos contendo esporos. Os cistos estavam localizados no citoplasma do oócito. Foi observada a presença de vários cistos por oócito e também de vários esporos por cisto. Em um exemplar foi observada uma distorção na membrana do núcleo do oócito, devido à presença do parasita no citoplasma (Fig. 6B - 6D).

Os vacúolos intracitoplasmáticos contendo os cistos tinham um formato elíptico a circular, com tamanho variando de 2 a 6 μ m (média 4,6 μ m, n = 10), contendo número variável de cistos.

Ancistrocoma-like

Protozoário ciliado do tipo *Ancistrocoma* foi observado no lúmen dos túbulos digestivos primários e secundários da glândula digestiva (Figuras 7A – 7C). Em uma ostra, o protozoário estava presente no tecido conjuntivo ao redor dos túbulos digestivos. Nenhuma reação hemocitária foi observada.

O ciliado possuía formato de pêra, com tamanho variando entre 5 e 17 μ m (média 9,9 μ m, n = 15), possuía um grande núcleo granular, basófilo (média 4,4 μ m, n = 10) e citoplasma eosinófilo. Em alguns indivíduos observou-se a presença do micronúcleo basófilo. As prevalências do patógeno são apresentadas na figura 9.

Sphenophrya-like

Protozoário ciliado do gênero *Sphenophrya* foi observado nas brânquias, em contato com o epitélio branquial, aderidos aos cílios branquiais e/ou entre os filamentos branquiais. Nos palpos labiais estavam em contato com o epitélio celular e no manto, foram observados aderidos ao epitélio através de seus cílios (Fig. 7D – 7F).

O formato do parasita variou entre arredondado a oval e seu tamanho entre 5 a 9 μ m (média 7,2 μ m, n = 15), com um macronúcleo basófilo denso com tamanho variando entre 2,5 a 5 μ m (média 3,9 μ m, n = 10) e um citoplasma eosinófilo. Em alguns espécimes foi possível observar a presença de um micronúcleo próximo ao macronúcleo. Esse ciliado foi encontrado sozinho ou formando grupo de 3-8 células (Fig. 7E). Nenhum dano ou alteração foi observado.

As prevalências do patógeno são apresentadas na figura 9.

Influência do Manejo

Entre os tratamentos analisados CM e SM, verificou-se que houve relação entre a presença dos protozoários ciliados e o tratamento.

Maiores prevalências do ciliado *Sphenophrya*-like e *Ancistrocoma*-like foram observadas nas ostras manejadas (CM) ao longo do experimento ($p = 0,0164$ e $p = 0,0043$, respectivamente). Os resultados podem ser melhor visualizados na figura 8.

Houve uma maior prevalência de *Sphenophrya*-like em ostras CM do verão ($p = 0,0002$). Como se pode observar na figura 9, as maiores prevalências desse protozoário foram encontradas nos meses de janeiro e fevereiro, período de temperaturas da água do mar mais altas.

Para o ciliado *Ancistrocoma*-like, não foram observadas diferenças significativas entre ostras CM do inverno e CM do verão. No entanto, estatisticamente, foi encontrado o valor de $p = 0,0550$, para as ostras CM no inverno.

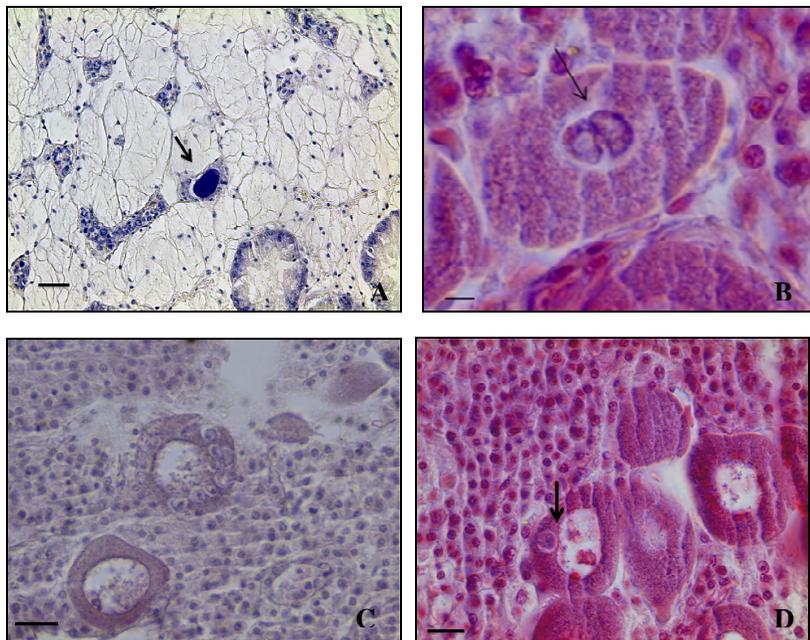


Fig. 6. Alterações e patógenos encontrados na ostra *Crassostrea gigas*. A - Gameta hipertrofiado (Barra= 20μm). B, C e D - Protozoário não identificado. Na figura D é possível visualizar o cisto distorcendo a membrana do núcleo do oócito (seta) (Barra= 10μm).

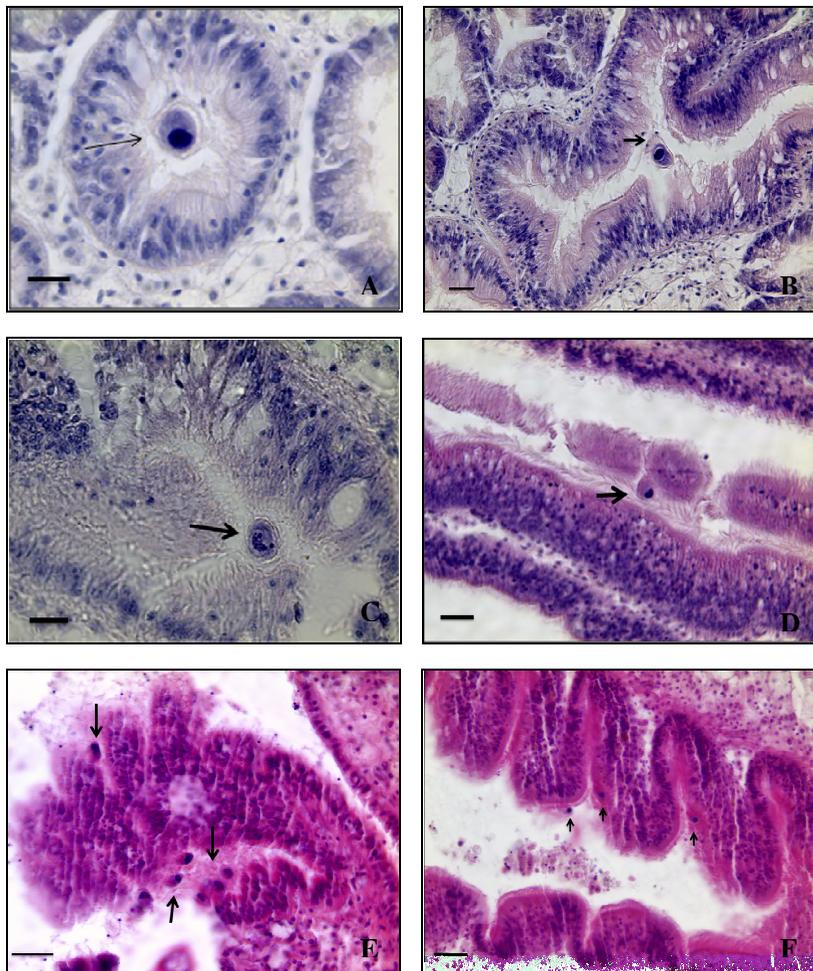


Fig. 7. A, B e C- Ciliados *Ancistrocoma*-like, no lúmen dos túbulos digestivos; seta mostrando os cílios (Barra= 20 μ m). D- Ciliado *Sphenophrya*-like entre os filamentos branquiais (Barra= 20 μ m). E- Ciliados *Sphenophrya*-like presentes no manto. As setas mostram a localização de sete patógenos (Barra= 10 μ m). F- Ciliado *Sphenophrya*-like (setas).

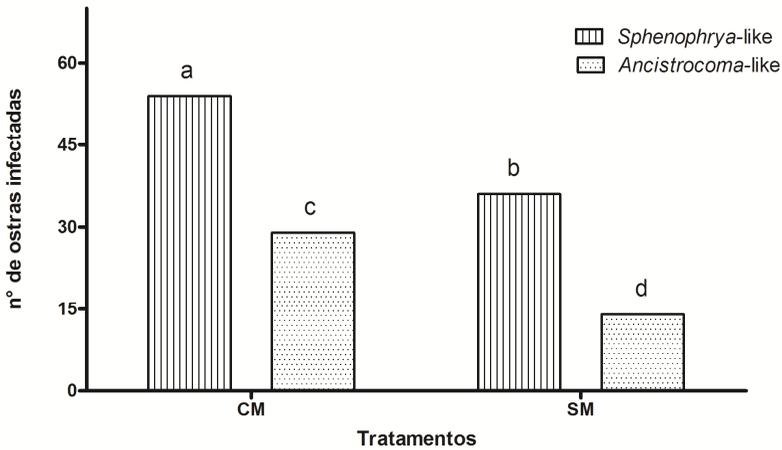


Fig. 8. Número de ostras infectadas pelos ciliados *Sphenophrya-like* e *Ancistrocoma-like* em ostras *Crassostrea gigas* manejadas (CM) e não manejadas (SM) durante o período de estudo. Letras diferentes significam diferenças estatísticas.

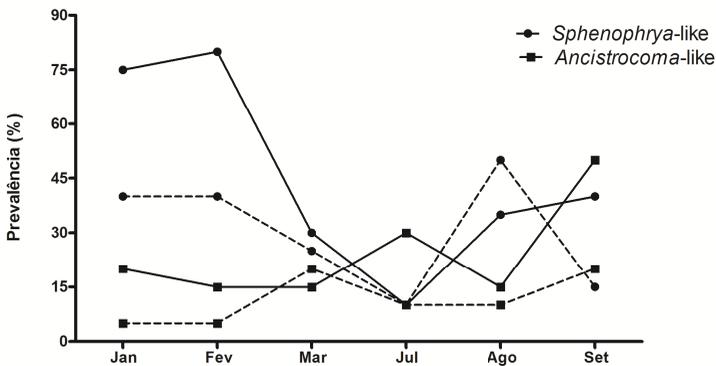


Fig. 9. Prevalências mensais (%) dos ciliados *Sphenophrya-like* e *Ancistrocoma-like* em ostras *Crassostrea gigas*. As linhas preenchidas representam valores de prevalências nas ostras com manejo (CM) enquanto as linhas pontilhadas representam valores de prevalência nas ostras sem manejo (SM).

4. Discussão

Como um ambiente dinâmico, o meio aquático providencia uma ampla variedade de estressores, como as flutuações bruscas de temperatura e salinidade e a presença de predadores e/ou competidores. O cultivo de ostras *Crassostrea gigas* poderia introduzir uma forma de estresse durante a manutenção, transporte e limpeza dos animais cultivados. Todavia, no presente estudo, não foi verificada diferença estatística nos valores de sobrevivência e no número de hemócitos entre ostras CM e SM. A análise do efeito do manejo de limpeza sobre a imunologia e histopatologia das ostras, mostrou que a expressão da proteína HSP70 e a prevalência dos protozoários ciliados *Ancistrocoma-like* e *Sphenophrya-like* foram significativamente maiores nas ostras manejadas.

Ostreicultores da região relatam taxas de sobrevivência em torno de 50% para ostras de 6cm, manejadas em dois momentos: quando colocadas no mar como sementes e semanas antes da retirada para comercialização. Esse relato mostra um resultado de sobrevivência semelhante ao encontrado neste trabalho, apesar da diferença na densidade de ostras utilizada pelos produtores no cultivo comercial, que é de aproximadamente 60 animais/andar da lanterna.

Uma ampla variedade de técnicas é usada para avaliar os efeitos de estressores em ostras, sendo que a maioria dos estudos mostra o efeito *in vitro* de fatores bióticos e abióticos. O presente estudo foi proposto com o objetivo de avaliar *in vivo*, se o manuseio dos animais empregado pelas práticas de cultivo utilizadas na região, denominado manejo, pode alterar a resposta funcional das células de defesa das ostras, que são os hemócitos. Para isso nós seguimos o protocolo de manejo utilizado pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM).

Quanto a contagem no número de hemócitos, Lacoste et al. (2002) citam que o estresse em ostras, gerado por distúrbios mecânicos, pode diminuir o número de hemócitos circulantes na hemolinfa desses animais. No presente estudo não houve mudança na THC das ostras nos diferentes tratamentos, talvez pelo fato da aplicação do estresse ter sido diferente da utilizada por esses autores. Ainda, os autores citam a importância dos estudos de parâmetros imunes desses animais, os quais podem fornecer informações sobre a resposta em curto prazo do animal em relação ao seu ambiente de cultivo, sem a necessidade de precisar esperar por mudanças no crescimento ou nas condições ao longo dos períodos. Roberts et al. (2012) também fez um estudo semelhante, com

Crassostrea virginica, não evidenciando diferenças no número de hemócitos, conforme os resultados encontrados no presente trabalho.

A THC das ostras mostrou apenas influência temporal: maior nos meses de verão: janeiro - março. O mesmo padrão foi observado para ostras *Crassostrea rhizophorae* analisadas em Florianópolis por Barth et al. (2005), em que os valores de THC foram maiores nos meses de temperaturas mais elevadas: verão e primavera.

Para *Crassostrea gigas*, diferente do observado no presente estudo, Malham et al. (2009) observaram aumentos no THC de ostras expostas a temperatura de 12°C, enquanto as ostras mantidas a 21°C tiveram menores valores de THC. Segundo Pipe & Coles (1995), o aumento nos valores de THC pode ser resultado da proliferação dos hemócitos dos tecidos para a hemolinfa, enquanto a diminuição no número dessas células pode ser resultado de lise celular ou aumento do movimento das células da hemolinfa para os tecidos. Não pode-se excluir que durante o estresse causado pelas práticas de manejo, os hemócitos também poderiam ser mobilizados para os tecidos feridos ou para os tecidos em que houvesse ataques de patógenos.

Nas análises a nível celular, a quantificação relativa da expressão da proteína de choque térmico HSP70 nos hemócitos, apresentou diferenças significativas nas ostras CM, sugerindo um papel dessas proteínas de estresse durante o manejo. Como são proteínas de proteção celular, essas formas induzíveis são transcritas para prevenir as proteínas da desnaturação durante o estresse sofrido durante as práticas do manejo, como o manuseio das lanternas. É importante considerar que fatores fisiológicos e fatores biológicos em respostas às práticas de cultivo, como altas densidades de patógenos, hipoxia e proximidades com o sedimento, são citados com fortes estressores e podem induzir a expressão de HSPs (Feder & Hofman 1999, Encomio & Chu 2005, Soletchnik et al. 2006, Burge et al. 2007), corroborando com o observado no presente estudo.

Encomio & Chu (2007) mostraram que a expressão de HSP é correlacionada com a presença de patógenos em *Crassostrea virginica*, tendo uma maior expressão de HSP69 as ostras infectadas por *Perkinsus marinus*; ostras preexpostas a estresse térmico subletal (40 ° C durante 1 h) e posteriormente desafiadas com *P. marinus* tiveram maior sobrevivência, indicando que a superexpressão HSP, devido ao calor, fornece tolerabilidade a um estímulo de estresse adicional, no caso *P. marinus*.

Monari et al. (2011), observaram a uma sobreexpressão de HSP70 na glândula digestiva do molusco de areia *Chamelea gallina*, em condições de anoxia, com alta temperatura (30 °C) e baixa salinidade (28‰).

No exame histopatológico, os protozoários ciliados foram os patógenos que tiveram maiores prevalências. Estudos citam que os ciliados são simbiossomas comuns em ostras (Lauckner 1983, Magalhães & Ferreira 2006, Pontinha 2009). Porém como cita Kinne (1983), as doenças podem afetar a eficiência dos processos metabólicos, reduzindo o potencial de crescimento e reprodução, assim como a resistência ao estresse, a competitividade e por fim, a sobrevivência do animal. Então, mesmo quando não causando danos aos cultivos, o acompanhamento dos parasitas é fundamental nos cultivos.

Entre os ciliados encontrados, destacaram-se os do tipo *Ancistrocoma*, os quais são encontrados na glândula digestiva de ostras, geralmente considerados não patogênicos (Bower et al. 1994). Nas lâminas analisadas, mesmo no caso em que foi encontrada grande quantidade do ciliado, não se observou nenhuma alteração microscópica no tecido ou infiltração hemocitária. O único efeito da presença do protozoário foi a oclusão ou interferência desses no lúmen do túbulo digestivo. O mesmo foi observado por Cáceres-Martínez et al. (2010) em estudos com a espécie *Crassostrea corteziensis* no México. Uma maior prevalência do protozoário foi encontrada nas ostras manejadas. Provavelmente essas ostras ficaram mais suscetíveis à entrada desse protozoário. Cabe ressaltar, que durante períodos de estresse, algumas funções de defesa das ostras, como a produção de espécies reativas de oxigênio, fagocitose e mesmo a migração dos hemócitos são inibidas durante a aplicação do distúrbio mecânico, o que pode providenciar uma oportunidade para certos patógenos se desenvolverem e se acumularem nos tecidos das ostras (Lacoste et al. 2002, Mydlarz et al. 2006). Ainda, Lacoste et al. (2001) demonstraram que moluscos estressados mostraram aumento na susceptibilidade a infecções por bactérias.

Durante os meses de coleta, as prevalências do ciliado foram estatisticamente semelhantes, no entanto os meses de inverno apresentaram valor de $p = 0,0550$. Com esse valor, pode-se deduzir que há certa influência da temperatura da água nas ostras manejadas nos meses de temperatura mais baixas, tendo prevalências de 31,7% do patógeno em relação às manejadas no período de verão, com prevalências de 16%. Um aumento no número amostral talvez possa evidenciar essa diferença.

Outro ciliado observado foi o protozoário *Sphenophrya*-like. Esse ciliado costuma ocorrer nas brânquias, palpos e manto nos moluscos (Bower et al. 1994). No presente estudo foram os protozoários de maiores prevalências. Diferentes morfologias desse ciliado foram observadas. Alguns deles pareciam atacar os filamentos, pois se observava uma conformação atípica das células ao redor de onde o patógeno estava aderido. Alguns indivíduos foram observados entre os filamentos branquiais, porém sem causar conformação nas células circundantes. Pareciam estar em forma livre, apenas ancorados entre os filamentos. Essas morfologias talvez correspondam a diferentes estágios de desenvolvimento da mesma espécie de *Sphenophrya* sp. (Cáceres-Martínez et al. 2010).

A prevalência de *Sphenophrya*-like também foi influenciada pelo manejo e uma relação temporal também foi constatada. As ostras manejadas nos meses de águas quentes tiveram prevalência de 62% do ciliado enquanto ostras manejadas nos meses de águas mais frias tiveram prevalência de 28,3% do ciliado ($p = 0,0002$). Pontinha (2009), estudando ostras *Crassostrea gigas* no município de Florianópolis, observou o oposto: maiores prevalências do patógeno em meses de águas frias. Para o mesmo município, da Silva et al. (2011a) observaram prevalências de 12,5% dos ciliados nas brânquias de *C. gigas*, nos meses de verão. No Brasil, também foi observada a presença de *Sphenophrya* sp. em ostras *C. rhizophorae*, no litoral da Bahia, com prevalência em torno de 2%, ainda os autores citam a formação de xenomas - hipertrofia celular devido ao acúmulo de parasitas dentro das células do epitélio branquial do hospedeiro, associando a presença de *Sphenophrya* sp. (Boehs et al. 2009)

O protozoário dos oócitos, não identificado, foi encontrado em baixas prevalências, sem influência do manejo. Da Silva et al. (2011) encontraram prevalências de 2,5% em *Crassostrea gigas* no litoral catarinense. Esse parasita é muito semelhante ao encontrado no presente estudo, porém técnicas mais aprimoradas precisam ser feitas para identificação da espécie. Poucos oócitos parasitados foram observados, esses aparentemente sem causar danos às gônadas. Foi observada a presença de vários vacúolos, como cistos parasitando os oócitos.

A alteração observada em alguns indivíduos foi uma hipertrofia dos gametas. Oócitos, espermatozóides e células germinativas hipertrofiadas têm sido observados em várias espécies do gênero *Crassostrea* (García et al. 2006). No estudo não foi possível caracterizar qual tipo celular estava hipertrofiado, pois em todos os indivíduos que a

alteração foi encontrada em indivíduos com gônadas vazias, não sendo possível determinar qual o gameta.

A hipertrofia dos gametas tem sido atribuída à infecção por um vírus do tipo Papillomavirus (García et al. 2006, Bower 2009). Não tem sido associada mortalidade ou alterações teciduais com a hipertrofia e nossos resultados concordam com essas observações. Pontinha (2009) estudando a mesma espécie no litoral catarinense encontrou prevalências de 1,4%, valor similar ao encontrado, enquanto Sabry et al. (2011), na mesma região e mesma espécie encontraram prevalência de 3,3% de células masculinas hipertrofiadas. Nos EUA, Winstead et al. (2004) encontraram prevalências menores que 1% em *Crassostrea virginica*. Choi et al. (2004) encontraram prevalências de até 7,7% em ostras *C. gigas* cultivadas na Coréia.

Podemos concluir, através dos resultados obtidos no estudo, que o manejo não influencia a sobrevivência e a contagem total de hemócitos. Todavia, a prevalência de patógenos, como os protozoários *Sphenophrya*-like e *Ancistrocroma*-like, assim como a expressão da proteína HSP70 são influenciadas pela prática de manejo.

5. Referências Bibliográficas

Barth T, Moraes N, Barraco MA (2005) Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* in different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. *Aquat Living Resour* 18:179-186.

Boehs G, Lenz TM, Villalba A (2009) Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. *Braz J Biol* 69:457-458.

Bower SM (2009) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: viral gametocytic hypertrophy of oysters. Acesso em: 15 Jan. <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/vghoy-eng.htm>.

Bower S, McGladdery SE, Price IM (1994) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu Rev Fish Dis* 4:1-199.

Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell stress chaperon 8:76-85.

Burge CA, Judah LR, Conquest LL, Griffin FJ, Cheney DP, Suhrbier A, Vadopalas B, Olin PG, Renault T, Friedman CS (2007) Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) grown in Tomales Bay, California, USA: the influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. J Shellfish Res 26:163–172.

Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G (2010) Parasites of pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. J Aquat Anim Health 22:141-151.

Carballal MJ, Villalba A, López C (1998) Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. J Invertebr Pathol 72:304–312.

Cellura C, Toubiana M, Parrinello N, Roch P (2007) Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. Fish Shellfish Immunol 22:340-350.

Cheney DP, Macdonald BF, Elston RA (2000) Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J Shellfish Res 19:353-359.

Choi DL, Lee NS, Choi HJ, Park MA, McGladdery SE, Park MS (2004) Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the pacif oyster *Crassostrea gigas* in Korea. Dis Aquat Org 59:205-209.

Da Silva PM, Magalhães ARM, Barraco MA (2011) Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. p 1-9. doi:10.1017/S0025315411001007

Da Silva PM et al. (2012) Status of *Perkinsus* spp. in oysters *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea brasiliiana* from Brazil: first

report of *Perkinsus marinus*. In: Nacional Shellfisheries Association. Program and Abstracts of the 104th Annual Meeting, Seattle, Washington/US.

Encomio VG, Chu FLE (2007) Heat shock protein (HSP70) expression and thermal tolerance in sublethally heat-shocked eastern oysters *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. Dis Aquat Org 76:251-260.

Encomio VG, Chu FLE (2005) Seasonal variation of Heat Shock Protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). J Shellfish Res 24:167-175.

Epagri (2011) Síntese informativa da maricultura 2010. Acesso em: 12. dez. 2011. http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=140&Itemid=173 >

Fabbri E, Valbonesi P, Franzellitti (2008) HSP expression in bivalves. Invertebrate survival J 5:135-161.

Farcy E, Voiseux C, Lebel JM (2009) Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. Cell stress chaperon 14:371-380.

Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61:243-282.

Feng SY (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am. Fish. Soc. Sp. Publ. 18:153-168.

Friedman CS, Estes RM, Stokes NA, Burge CA, Hargrove JS, Barber BJ, Elston RA, Burrenson EM, Reece KS (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Dis Aquat Org 63:33-41.

García C, Robert M, Arzul A, Chollet B, Joly J-P, Miossec L, Comtet T, Berthe F (2006) Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to disease emergence? Dis Aquat Org 70:193-199.

Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 53:187-196.

Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, Taillade S (1998) Summer mortality of the pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). ICES Statutory Meeting, Population Biology, Mariculture Committee CM 1998/CC.

Kinne O (1983) Diseases of marine animals. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland.

Lacoste A, Malham SK, Gélébart F, Cueff A, Poulet SA (2002) Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev comp immunol* 26:1-9.

Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gélébart F, Cordevant C, Lange M, Poulet S (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Org* 46:139-145.

Lauckner G (1983) Diseases of mollusca: Bivalvia. In: Kinne, O. (Ed.) Diseases of marine animals, Vol II, "Bivalvia to Scaphopoda". Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 477-961 .

Lesser MP, Bailey MA, Merselis DG, Morrison JR (2010) Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the gulf of Maine. *Comp Biochem Physiol A* 156:542-551.

Magalhães ARM, Ferreira JF (2006) Patologias e manejo em malacocultura. In: Siva-Souza, A.T. (Ed.) Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Abrapoa, Maringá.

Malham SK, Cotter E, O'Keeffe S, Lynch S, Culloty SC, King JW (2009) Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture* 287:128-138.

Monari M, Foschi J, Rosmin R, Marin MG, Serrazanetti GP (2011) Heat shock protein 70 response to physical and chemical stress in *Chamelea gallina*. *J Exp Mar Biol Ecol* 397-2:71-78.

Mydlarz LD, Jones LE, Harvell CD (2006) Innate Immunity, environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:251-288.

Perez DG, Fontanetti CS (2011) Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ Monit Assess* 177:437-447.

Piano A, Valbonesi P, Fabbri E (2004) Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell stress chaperon* 9-2:134-142.

Pipe RK, Coles JA (1995) Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 5:581-595.

Poli CR (2004) Cultivo de ostras do Pacífico, *Crassostrea gigas*. In: Poli CR, Poli ATB, Andreatta E, Beltrame E. (eds) *Aquicultura: Experiências brasileiras, Multitarefa, Florianópolis*.

Poli CR (1992) A mortalidade em massa de verão da ostra japonesa (*Crassostrea gigas*). In: VII Simbraq e II Enbrapoa, Florianópolis.

Pontinha VA (2009) Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada em Florianópolis/SC. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Porte C, Biosca X, Solé M, Albaigés J (2001) The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environ Pollut* 1129(2):261-268.

Roberts SB, Sunila I, Wikfors GH (2012) Immune response and mechanical stress susceptibility in diseased oysters, *Crassostrea virginica*. *J Comp Physiol B*. 182, 41-48. DOI 10.1007/s00360-011-0605-z

Sabry RC, Rosa RD, Magalhães ARM, Barracco MA, Gesteira TCV, Da Silva PM (2009) First report of *Perkinsus sp.* infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. *Dis Aquat Org* 88:13-23.

Sabry RC, Da Silva PM, Gesteira TCV, Pontinha VA, Magalhães ARM, (2011) Pathological study of oysters *Crassostrea gigas* from culture and *C. rhizophorae* from natural stock of Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Aquaculture* 320:43-50.

Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P (2006) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328-338.

Song L et al. (2011) Bivalve immunity. In: Söderhäll, K. Invertebrate immunity. Estados Unidos da América: Lander Bioscience.

Watermann BT, Herlyn M, Daehne B, Bergmann S, Meemken M, Kolodzey H (2008) Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J Fish Dis* 31:621–630.

Winstead JT, Volety AK, Tolley SG (2004) Parasitic and symbiotic fauna in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and estuary in Florida. *J Shellfish Res* 23:831–840.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq e à CAPES pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa concedida ao primeiro autor. Ao Laboratório de Malacologia experimental do Departamento de Aquicultura da UFSC, por viabilizar este trabalho. Ao Laboratório de Moluscos Marinhos pela doação dos animais utilizados no experimento e utilização das estruturas de cultivo. À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI através do projeto CNPQ/Processo 561506/2010-8, pelo fornecimento dos dados de temperatura da água referentes ao mês de setembro de 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ABBAS, K.A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6º ed., USA: Saunder Elsevier, 2010. Disponível em <<http://books.google.com.br/books?id=IcLJevp2Kx0C&printsec=frontcover&dq=abbas+IMMUNOLOGY&hl=pt-BR&sa=X&ei=YC7qTuacGqjs0gGTocnmCQ&ved=0CDoQ6AEwAA#v=onepage&q=abbas%20IMMUNOLOGY&f=false>> Acesso em 15 .dez.2011.

BMLP – MANUAL DE MARICULTURA. In: Lucia valente edição, editor multitarefa, 2003. Manuais de maricultura - Cultivo de ostras

BARTH, T. **Parâmetros hemato-imunológicos e perfil histológico de alguns tecidos de ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae***. 2002. 61 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BERTHELIN, C.; KELLNER, K.; MATHIEU, M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125 B, p. 359–369, 2000.

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

CELLURA, C. et al. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 340-350, 2007.

CHENEY, D.P.; MACDONALD, B.F.; ELSTON, R.A. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. **Journal of Shellfish Research**, v. 19, p. 353–359, 2000.

DA SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, A.M. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels

from a culture station in Ratonas Grande Island, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, p. 154–162, 2002.

DA SILVA, P.M. et al. Status of *Perkinsus* spp. In oysters *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea brasiliiana* from Brazil: first report of *Perkinsus marinus*. In: Nacional Shellfisheries Association. Program and Abstracts of the 104th Annual Meeting, 2012, Seattle, Washington/US, p 140. **Resumo.**

DORE, I. **Shellfish: a guide to oysters, mussels, scallops, clams and similar products for the commercial user.** Van Nostrand Reinhold, New York: 1991.

ENCOMIO, V.G.; CHU, F.L.E. Seasonal variation of Heat Shock Protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). **Journal of Shellfish Research**, v. 24, p. 167–175, 2005.

ENCOMIO, V.G; CHU, F.L.E. Heat shock protein (hsp70) expression and thermal tolerance in sublethally heat-shocked eastern oysters *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 76, p. 251-260, 2007.

EPAGRI. Síntese informativa da maricultura 2010. Florianópolis: Epagri, 2011. Disponível em: <http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=140&Itemid=173>. Acesso em: 12.dez. 2011.

FABBRI, E.; VALBONESI, P.; FRANZELLITTI, S. HSP expression in bivalves. **Invertebrate Survival Journal**, v. 5, p. 135–161, 2008

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2008. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2008.** Roma. Departamento de Pesca e Aquicultura da FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm>>. Acesso em: 21 setembro 2010.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2009. **Fisheries & Aquaculture.** Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?ds=>

Aquaculture&k1=SPECIES&k1v=1&k1s=3514&outtype=html>.
Acesso em: 12 dezembro 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2010. **The State of World Fisheries and Aquaculture (Sofia) 2010**. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e01.pdf>>. Acesso em: 12 dezembro 2011.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.

FENG, S.Y. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. **American Fisheries Society Special Publication**, v. 18, p. 153-168, 1988.

FISHER, W.S.; OLIVER, L.M.; EDWARDS, P.E. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 554 -564, 1996.

FRIEDMAN, C.S. et al. Herpes virus in juvenile pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, p. 33–41, 2005.

GOULLETQUER, P. et al. Summer mortality of the pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France), ICES Statutory Meeting, Population Biology, Mariculture Committee CM 1998/CC . 1998, p. 14–20.

IBBOTSON, D.P. **Poliquetas espionídeos em ostras *Crassostrea gigas* e no plâncton da Praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis/SC- Brasil**. 2002. 71 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

IVANINA, A.V.; TAYLOR, C.; SOKOLOVA, I.M. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 245–254, 2009.

JACKSON, S.A.; UHLINGER, K.R.; CLEGG, J.S. Duration of induced thermal tolerance and tissue-specific expression of hsp/hsc70 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* and the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v. 317, p. 168–174, 2011.

LACOSTE, A. et al. Stress – induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. **Development and Comparative Immunology**, v. 26, p. 1–9, 2002.

MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F. Patologias e manejo em malacocultura. In: Siva-Souza, A.T. (eds.) **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá, 2006.

MAGALHÃES, A.R.M. et al. Sanidade de Peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: Valenti, W. C., Poli, C.R., Pereira, J. A., Borghetti, J.R. (Eds), **Aquicultura no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq / Ministério da Ciência e tecnologia, 2000, p. 221–231

OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.4.00_INTRO_MOLLUSCS.pdf> Acesso em 08 fevereiro 2012.

OIE. Listed diseases 2012. Disponível em < <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2012/>> Acesso em 06 de junho de 2012.

PARRY, H.E.; PIPE, R.K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). **Aquatic Toxicology**, v. 69, p. 311–325, 2004.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 177, p. 437–447, 2011.

PILLAY, T.V.R.; KUTTY, M.N. **Aquaculture: principles and practices**. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books>>. Acesso em: 20 dezembro 2011.

POLI, C.R. A mortalidade em massa de verão da ostra japonesa (*Crassostrea gigas*). In: VII Simbraq e II Enbrapoa, 1992. Florianópolis. **Resumo.**

POLI, C.R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*). In: Poli, C.R., Poli, A.T.B., Andreatta E., Beltrame E. (Eds), **Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004, p. 251–266.

PORTE, C. et al. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). **Environmental Pollution**, v. 112, p. 261-268, 2001.

PORTELA, M.M.C. **Estudio de la respuesta imune y expresión génica del mejillón mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis***. 2008. 294 f. Tese (Doutorado em Biologia). Universidade de Vigo, Espanha.

PONTINHA, V.A. **Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada em Florianópolis/ SC**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**, v. 172, p. 125-145, 1999.

SABRY, R.C.; MAGALHÃES, A.R.M. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 194-203, 2005.

SABRY, R.C. et al. First report of *Perkinsus sp.* infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 13-23, 2009.

SNYDER, M.J; GIRVETZ, E.; MULDER, E.P. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 22–29, 2001.

SONG, L. et al. Bivalve immunity. In: Söderhäll, K. **Invertebrate Immunity**. Estados Unidos da América: Lander Bioscience, 2011. p. 44-62. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=m3r140Qg2kkC&pg=PA299&dq=molecular+chaperones+and+heat+shock+proteins+in+invertebrates&hl=pt-BR&sa=X&ei=qB7qTr2-OaTn0QH21Ym0CQ&ved=0CEYQ6AEwAg#v=onepage&q=hsp&f=false>> Acesso em: 15 dezembro 2011.

SRIVASTAV, P. Roles of heat – shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, março. 2002.

WATERMANN, B.T. et al. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. **Journal of Fish Disease**, v. 31, p. 621–630, 2008.