

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Danielle Ferraz Mello

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICROALGAS NOCIVAS E
FICOTOXINAS EM HEMÓCITOS DE OSTRAS DO PACÍFICO
Crassostrea gigas

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica do Centro
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Margherita
Anna Barracco

FLORIANÓPOLIS

2012

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

M527a Mello, Danielle Ferraz

Avaliação do efeito de microalgas nocivas e ficotoxinas em hemócitos de ostras do pacífico *crassostrea gigas* [dissertação] / Danielle Ferraz Mello ; orientador, Alcir Luiz Dafre. - Florianópolis, SC, 2012.

76 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Saxitoxina. 3. Bivalve. 4. Genética - Expressão. 5. Sistema imune. 6. Antioxidantes. I. Dafre, Alcir Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, Dr. Alcir Luiz Dafre, por todo apoio e dedicação durante todo o meu mestrado. Pelos momentos de descontração, sendo o professor mais animado das confraternizações, até mais que os próprios alunos! Por ser essa pessoa tão querida e super paciente com seus alunos, mas nunca deixando de priorizar a qualidade e rigor de nossos trabalhos.

À minha co-orientadora Dra. Margherita Anna Barracco que me vem orientando desde o início da graduação, sempre com grande dedicação, rigor, apoio e incentivo durante esses quase 5 anos de convivência, e por toda confiança depositada em mim neste processo. Gostaria aqui, de me delongar um pouco mais e fazer uma homenagem a essa pessoa tão especial, pois ela em muito breve se aposenta e o que faz de mim sua última orientanda. A Marghe foi sempre uma profissional extremamente dedicada e apaixonada tanto pela pesquisa, quanto pelo ensino, despertando em seus alunos uma enorme admiração tanto pela sua pessoa quanto pela matéria que se dedicou a ensinar por muitos anos (Biologia Celular). Agradeço por ter convivido esses cinco anos com ela, tendo de perto um grande exemplo de professor universitário a se seguir! Além de ser sua fã, sou também muito grata por nossa amizade que foi crescendo exponencialmente ao longo desses últimos anos e que com certeza vou levar pro resto da vida. A Marghe só não vai representar uma enorme perda pro curso de Biologia, porque ela pretende permanecer como professora voluntária, o que evidencia ainda mais o amor que ela tem por sua profissão. Marghe, você é um exemplo pra todos nós!!

À todos os amigos do Laboratório de Defesas Celulares e do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído! Às muitas risadas e companheirismo que para mim são as características mais marcantes de ambos os grupos e que eu vou levar sempre em minha memória! Realmente tenho muita sorte de revezar entre dois laboratórios, onde existem pessoas tão legais de se conviver.

Ao Erik, que foi meu colega de mestrado, dividindo o mesmo projeto de pesquisa, projeto este que tinha muitos desafios e dificulda'

a serem superados, mas apesar disso, acredito que tivemos êxito um com a ajuda do outro.

Em especial à Eliza e ao Renato, “meus IC’s” queridos, que sem eles não sei o que seria desse mestrado. Eles foram não só uma grande ajuda nos experimentos, principalmente aqueles que varavam a madrugada (!!!), mas o fizeram sempre com muita simpatia, bom humor e dedicação! Além disso, eles me ajudaram a desenvolver o meu lado de “orientadora”, com certeza, contribuindo muito pra minha formação. E aprenderam tão bem que muitas vezes até me corrigiam (né, Eliza??? hehehe)!

À Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua e Dra. Hélène Hégaret pela oportunidade de colaboração nos experimentos com a microalga *Alexandrium minutum* e a saxitoxina e por se disporem a tirar várias dúvidas minhas ao longo do mestrado.

Ao Dr. Mathias Alberto Schramm, pela colaboração com as análises de LC-MS/MS com a microalga *Heterosigma akashiwo*, o que ajudou a comprovar de uma vez por todas, depois de quase um ano de testes que a nossa cepa não estava produzindo toxinas!

Ao Prof. Afonso Celso Dias que bondosamente cedeu alíquotas de alguns primers (CYP356A1, GSTO, FABP) da ostra *Crassostrea gigas*, possibilitando a ampliação das análises de expressão gênica que no final surtiram em resultados interessantes.

À Fazenda Marinha Atlântico Sul na pessoa de Nelson Silveira Júnior por fornecer as ostras utilizadas nos experimentos.

À UFSC pela bolsa CAPES-REUNI fornecida durante esses dois anos e ao CNPq pelo financiamento deste projeto, através do Edital Universal/2008.

A todos os meus queridos amigos que contribuíram cada um de forma única e especial durante esse período, pelos vários momentos de alegria e também pelo apoio nos momentos mais difíceis várias vezes fazendo o papel da família quando esta estava longe!

Ao meu querido Rafa (ou Trevisan, para a maioria) que esteve ao meu lado desde o início da Universidade, acompanhando de perto toda a minha trajetória no curso de graduação e agora no mestrado e com quem eu sempre pude contar durante todo esse período tanto no que diz respeito aos estudos, quanto na vida pessoal, com muito amor e carinho! Pela colaboração direta realizada neste trabalho, ajudando nas padronizações dos ensaios de viabilidade e nos experimentos longos que se estendiam até de madrugada! Espero que essa nossa caminhada que

mistura muito amor e colaboração no trabalho possa perdurar até o fim!!!

À minha família que eu amo demais e que foi a principal responsável por eu ter chegado aonde cheguei hoje! Essa família que é extremamente amorosa, carinhosa, amiga e educadora. Eu agradeço a Deus todos os dias por ter vocês ao meu lado. Em especial minha querida avó Aglaís e em memória do meu querido avô Daniel que foram as pessoas que mais acreditaram em mim, pelo apoio constante mesmo à distância com palavras de incentivo, amor e carinho e por fornecer todo o suporte necessário para que eu tivesse uma boa educação. Gostaria de fazer uma homenagem especial ao meu avô Daniel, que foi para a Glória, junto de Deus, enquanto eu ainda estava no início do mestrado, e que foi um exemplo de pessoa inquestionavelmente honesta, justa, carinhosa, amorosa e temente a Deus! Te amo muito vovô!!

À Deus e seu filho Jesus, meu guia, mestre e amigo, cujo exemplo de amor ao próximo eu tento seguir todos os dias, pois pra mim o amor é o resumo de todas as leis e somente quando nós amarmos mais uns aos outros e pensarmos menos em nós mesmos, é que esse mundo vai ser mais humano, com menos violência, crueldade e desigualdades e com mais respeito às pessoas e à natureza.

RESUMO

Os hemócitos são responsáveis por mediar uma série de reações imunológicas essenciais para a sobrevivência de bivalves. Dentre os vários fatores de estresse ambientais os quais os bivalves estão sujeitos, pode-se citar as florações de algas nocivas (FANs) que devido ao aumento abrupto de sua biomassa e produção de ficotoxinas, causam grandes prejuízos aos ecossistemas costeiros. O impacto dessas algas nocivas e suas ficotoxinas no sistema imune dos bivalves são, porém muito pouco conhecidos ainda. Para melhor compreender os possíveis efeitos dessas microalgas e suas toxinas no sistema imune de bivalves, hemócitos da ostra *Crassostrea gigas* foram expostos *in vitro* à microalga *Alexandrium minutum*, aos produtos extracelulares (PECs) da microalga *Heterosigma akashiwo* e às neurotoxinas purificadas saxitoxina (STX) e brevetoxina (PbTx-2). Foram então analisados alguns parâmetros celulares e a expressão quantitativa (qPCR) de 11 genes associados aos sistemas imunológico, antioxidante, de estresse e de biotransformação. Os resultados mostraram que apesar da viabilidade e a complexidade dos hemócitos se manterem inalteradas após incubação com *A. minutum* (1:6, alga/hemócito) ou com sua toxina STX (0,0375 µg/L), a capacidade fagocítica fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio foram prejudicadas em ambos os tratamentos (30 % e ≥ 38 % menores, respectivamente). Houve ainda, um aumento do tamanho dos hemócitos granulares (33 %) incubados apenas com as microalgas. Por outro lado, os hemócitos das ostras incubados com os PECs de *H. akashiwo*, microalga supostamente produtora de brevetoxinas (PbTx_s) ou com diferentes concentrações de PbTx-2 (3 a 1.000 µg/L) também não tiveram sua viabilidade alterada. Além disso, as maiores concentrações de PbTx-2 testadas (300 e 1.000 µg/L) também não foram capazes de induzir a apoptose nos hemócitos. As análises de expressão gênica revelaram um aumento no número de transcritos da citocina IL-17 (4,5x) após 4 h de exposição à *A. minutum*, assim como, após exposição apenas à STX, da chaperona Hsp70 (2x) e do peptídeo antimicrobiano defensina (Defh2) (7x). Por outro lado, hemócitos incubados com a STX apresentaram também uma diminuição nos níveis de transcritos da IL-17 (10x) e de uma isoforma de citocromo P450 (CYP356A1) (3,6x). Com relação à PbTx-2 (1.000 µg/L) houve um aumento no número de transcritos da Hsp70 (2,4x) e do CYP356A1 (2x) e uma tendência a maiores valores para o gene que codifica a *fatty acid binding protein* (FABP) (2,8x). Em conjunto, estes resultados

sugerem que a STX em geral promove uma imunossupressão dos hemócitos de ostras, enquanto que a PbTx-2 estimula a expressão de genes associados a respostas de estresse e detoxificação, mas não de genes associados aos sistemas imune e antioxidante. Os resultados claramente demonstram que as ficotoxinas apresentam efeitos específicos e interferem com a expressão gênica de hemócitos sendo, portanto, potencialmente tóxicas para bivalves.

Palavras-chave: *Alexandrium minutum*; *Heterosigma akashiwo*; saxitoxina; brevetoxina; bivalves; hemócitos; expressão gênica; sistemas imune, antioxidante e de detoxificação.

ABSTRACT

Hemocytes mediate a series of immune reactions essential for bivalve survival, however, the impact of harmful algal species and their associated phycotoxins upon bivalve immune system is under debate. To better understand the possible toxic effects of these harmful algae and their toxins, *Crassostrea gigas* hemocytes were exposed *in vitro* to the toxic microalgae *Alexandrium minutum* and the extracellular compounds (ECs) of *Heterosigma akashiwo* and to purified neurotoxins such as saxitoxina (STX) and brevetoxin (PbTx-2), and submitted to cellular and quantitative gene expression analysis (qPCR). The results showed that despite the complexity and viability of hemocytes remained unchanged after incubation with *A. minutum* (1:6, algal cells/hemocytes) and its corresponding toxin, STX (0.0375 µg/L), hemocytes showed a significant decrease in their phagocytic index (30 %) and production of reactive oxygen species (≥ 38 %) and also an increase in the size of the granular hemocytes (33 %), but only with microalgae incubation. Oyster hemocytes incubated with the ECs of *H. akashiwo*, microalgal species that apparently produces brevetoxins, also retained full cell viability, as well as when incubated with PbTx-2 concentrations up to 1.000 µg/L. In addition, the highest PbTx-2 concentrations (300 and 1.000 µg/L) also did not induce apoptosis in hemocytes. Gene expression analysis in oyster hemocytes presented an increase in the transcripts levels of the gene encoding the cytokine IL-17 (4.5-fold) after 4 h exposure to *A. minutum*, as well as an increase in the genes encoding the chaperone Hsp70 (2-fold) and the antimicrobial peptide defensin (Defh2) (7-fold), after STX exposure. On the other hand, hemocytes incubated with STX also showed a decrease in the transcripts levels of genes encoding IL-17 (10-fold) and a cytochrome P450 isoform (CYP356A1) (3.6-fold). Regarding PbTx-2 treatments, only the concentration of 1.000 µg/L was able to cause significant effects on hemocytes gene expression after a 4 h incubation period, causing an increase in the transcript levels of Hsp70 (2.4-fold) and CYP356A1 (2-fold) and also a tendency to higher transcript levels of the gene encoding the fatty acid binding protein (FABP) (2.8-fold). Together, these results suggest that STX, in general, apparently caused immunosuppression of oyster hemocytes, whereas PbTx-2 stimulated the expression of genes associated with defense mechanisms related to stress and detoxification, but not related to the immune and antioxidant systems. The results clearly demonstrate that

phycotoxins trigger specific responses and modulate gene expression in hemocytes, which can be potentially toxic to bivalves.

Keywords: *Alexandrium minutum*; *Heterosigma akashiwo*; saxitoxin; brevetoxin; bivalves; hemocytes; gene expression; immune, antioxidant and detoxification systems.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMFE** – Água do mar filtrada estéril
ASP – *Amnesic Shellfish Poisoning*
BPI – *Bactericidal/permeability increasing protein*
cDNA – DNA complementar
Defh2 – *Hemocyte defensin 2*
DSP – *Diarrheic Shellfish Poisoning*
EcSOD – *Extracellular superoxide dismutase*
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FABP – *Fatty acid binding protein*
FAN – Floração de algas nocivas
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPx – Glutaciona peroxidase
GSTO – Glutaciona S-transferase ômega
HG – Hemócitos granulares
HH – Hemócitos hialinos
Hsp70 – *Heat shock protein 70*
IL-17 – Interleukin-17
IP – Iodeto de propídeo
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NSP – *Neurotoxic Shellfish Poisoning*
PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns*
PbTx - Brevetoxina
PECs – Produtos extracelulares
PRP – *Pattern recognition proteins*
Prx6 – Peroxiredoxina 6
PSP – *Paralytic Shellfish Poisoning*
qPCR – *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*
SOD – Superóxido dismutase
STX - Saxitoxina
VN – Vermelho neutro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química de uma saxitoxina (STX). Em realce, destaca-se o grupo ‘diidroxí’ que confere toxicidade à molécula. Adaptado de KALAITZIS et al. (2010).....26
- Figura 2.** Estrutura química da brevetoxina PbTx-2 (tipo B). Em realce, pode-se observar a cadeia lateral idêntica para os diferentes tipos de PbTxS. Adaptado de PLAKAS et al. (2010)28
- Figura 3.** Citogramas de densidade mostrando (A) populações de hemócitos de *Crassostrea gigas* ou (C) hemócitos mais as células de *Alexandrium minutum*, em função de seu tamanho (Forward Scatter-FSC) ou complexidade (Side Scatter-SSC), (B) intensidade de fluorescência verde (FL1) evidenciando as partículas contendo DNA marcado com SYBR Green (hemócitos), ou (D) intensidade de fluorescência vermelha (FL3) evidenciando as microalgas. HG = hemócitos granulares e HH = hemócitos hialinos.....45
- Figura 4.** (A) Citograma de densidade e (B) histograma de fluorescência (FL1) de amostras de hemócitos de *C. gigas* incubados com microesferas fluorescentes para a análise da taxa de fagocitose. R1 = região correspondente aos hemócitos. O histograma representa somente a população selecionada pela R1 e M1 corresponde aos hemócitos que fagocitaram três ou mais microesferas.....46
- Figura 5.** Análises em citometria de fluxo dos hemócitos da ostra *C. gigas*, incubados com a alga nociva *A. minutum* (1:6, alga/hemócito) ou com saxitoxina (STX – 0,0375 µg/L), durante 4 h. Controle - hemócitos incubados apenas em água do mar filtrada estéril (AMFE). As barras representam média + desvio padrão (N=3 *pools* de 10-12 animais). * p<0,05 e ** p<0,01 representam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle para os hemócitos hialinos (HH), com exceção do gráfico (D), uma vez que não é possível distinguir os HG dos HH após a fagocitose. # representa diferenças estatísticas com p<0,05 em relação ao grupo controle, para os hemócitos granulares (HG).....47

Figura 6. Expressão relativa dos 11 genes analisados em hemócitos de ostras *C. gigas* expostos à microalgas *A. minutum* (1:17, alga/hemócito) e saxitoxina (STX – 0,025 µg/L) durante 4 h. Linha pontilhada representa o grupo controle - hemócitos incubados apenas em água do mar filtrada estéril (AMFE). As barras representam médias + desvio padrão (N=3 pools de 10-12 animais).* representa diferenças significativas (p<0,05) para cada gene em relação ao seu grupo controle.....49

Figura 7. Viabilidade dos hemócitos de *C. gigas*, avaliada pelos ensaios do VN e MTT após incubação com os produtos extracelulares (PECs) de duas culturas de *H. akashiwo* em estágios diferente de crescimento (PEC1 – crescimento exponencial; PEC2 – fase estacionária). Controle – hemócitos incubados com meio de cultura estéril. As barras indicam as médias + desvio padrão (N=3 pools de 6 animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos...50

Figura 8. Viabilidade dos hemócitos de *C. gigas* avaliada através do ensaio do VN (A) e MTT (B) após incubação com diferentes concentrações de PbTx-2. Controle - hemócitos incubados em água do mar filtrada estéril (AMFE). As barras indicam as médias + desvio padrão (N=3-4 pools de 6-30 animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.....51

Figura 9. Porcentagem de hemócitos de *C. gigas* apresentando sinais de apoptose e/ou micronúcleo após 12 h de exposição a 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2. Controle - hemócitos incubados em água do mar filtrada estéril (AMFE). Barras indicam médias + desvio padrão (N=3 pools de 6-7 animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.....52

Figura 10. Expressão relativa dos 11 genes analisados em hemócitos de ostras *C. gigas* expostos a 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2 durante 4 h. Linha pontilhada representa o grupo controle - hemócitos incubados água do mar filtrada estéril (AMFE). O símbolo “vazio” (∅) indica que não foi possível amplificar os transcritos do gene indicado. As barras

representam médias + desvio padrão (N=5 pools de 5-9 animais).*
(p<0,05) e ** (p<0,01) representam diferenças significativas para cada
gene em relação ao seu grupo controle.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes selecionados, sequência dos iniciadores utilizados para as análises de qPCR e números de acesso no GenBank.....39

Tabela 2. Parâmetros analisados em cada estudo. *Estudo 1* – efeito da microalga nociva *Alexandrium minutum* e da saxitoxina (STX) purificada e, *Estudo 2* – efeito da microalga *Heterosigma akashiwo* e da brevetoxina (PbTx-2) purificada, sobre os hemócitos de ostras *Crassostrea gigas*.....43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Distribuição e cultivo de <i>Crassostrea gigas</i>	23
1.2 Algas nocivas e ficotoxinas	24
1.2.1 Saxitoxinas (STXs) e microalgas nocivas do gênero <i>Alexandrium</i>	25
1.2.2 Brevetoxinas (PbTx) e a microalga nociva <i>Heterosigma akashiwo</i>	27
1.3 Efeito de microalgas nocivas e suas ficotoxinas em bivalves	29
1.4 Sistema imune e sistemas de defesa associados em bivalves	30
2. OBJETIVO GERAL	34
2.1 Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 <i>Estudo 1</i> – Efeito <i>in vitro</i> do dinoflagelado <i>A. minutum</i> e da saxitoxina (STX) em hemócitos de ostras <i>C. gigas</i>	35
3.1.1 Material Biológico.....	35
3.1.2 Extração de hemolinfa.....	35
3.1.3 Desenho experimental	36
3.1.4 Análises de citometria de fluxo	36
3.1.5 Análises de expressão gênica	38
3.1.6 Estatística	39
3.2 <i>Estudo 2</i> - Efeito <i>in vitro</i> da microalga <i>H. akashiwo</i> e da brevetoxina purificada (PbTx-2) em hemócitos de ostras <i>C. gigas</i>	40
3.2.1 Material biológico	40
3.2.2 Desenho experimental	40
3.2.3 Determinação da viabilidade dos hemócitos através do ensaio do MTT e vermelho neutro (VN).....	44

3.2.4 Determinação da porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleo.....	42
3.2.5 Análises de expressão gênica.....	42
3.2.6 Estatística	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 <i>Estudo 1</i> - Efeito <i>in vitro</i> do dinoflagelado <i>Alexandrium minutum</i> e da saxitoxina (STX) em hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	44
4.1.1 Citometria de fluxo	44
4.1.2 Expressão gênica.....	48
4.2 <i>Estudo 2</i> - Efeito <i>in vitro</i> da microalga <i>Heterosigma akashiwo</i> e da toxina purificada brevetoxina (PbTx-2) em hemócitos de ostras <i>C. gigas</i>	48
4.2.1 Viabilidade dos hemócitos expostos aos produtos extracelulares (PECs) de <i>H. akashiwo</i>	48
4.2.2 Viabilidade dos hemócitos incubados com diferentes concentrações de PbTx-2	50
4.2.3 Porcentagem de hemócitos apoptóticos incubados com PbTx-2 .	50
4.2.2 Expressão gênica.....	52
5. DISCUSSÃO	54
5.1 <i>Estudo 1</i> - Efeito <i>in vitro</i> do dinoflagelado <i>Alexandrium minutum</i> e da saxitoxina (STX) em hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	54
5.2 <i>Estudo 2</i> - Efeito <i>in vitro</i> da microalga <i>Heterosigma akashiwo</i> e da toxina purificada PbTx-2 em hemócitos de ostras <i>C. gigas</i>	59
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição e cultivo de *Crassostrea gigas*

A ostra *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793 é um molusco bivalve pertencente à família Ostreidae (Mollusca, Bivalvia), com uma distribuição mundial ocorrendo principalmente em países da costa do oceano Pacífico, como o Japão. Hoje ela pode ser encontrada, Austrália, costa oeste dos Estados Unidos e na Europa (GUO *et al.*, 2008).

Esta espécie conhecida também como ostra Japonesa ou ostra do Pacífico é provavelmente o bivalve mais cultivado no mundo. Sua produção mundial chegou a expressiva soma de mais de 6 milhões de toneladas em 2008 (FAO, 2009), sendo a China o maior produtor (representando 84% da produção mundial), seguida pela Coreia do Sul, Japão e França (FAO, 2009).

A entrada da ostra do Pacífico no Brasil se deu na década de 1970, quando estas foram importadas da Inglaterra. Nesta época foram iniciados os primeiros cultivos experimentais no Estado do Rio de Janeiro, porém sem sucesso econômico (FERREIRA & NETO, 2006). Na década de 80 iniciaram-se os primeiros projetos de pesquisa visando o cultivo de ostras e mexilhões no Estado de Santa Catarina (SC). Estes estudos foram realizados pelo Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (POLI & LITLLEPAGE, 1998), levando o estado de SC ao patamar de maior produtor de bivalves a nível nacional. SC contribui com cerca de 90 % da produção nacional de moluscos marinhos, sendo que em 2010 comercializou aproximadamente 2.000 toneladas de ostras (EPAGRI/CEDAP, 2010). A produção destes bivalves marinhos constitui, portanto, uma importante atividade sócio-econômica na região, uma vez que centenas de famílias dependem direta e indiretamente da maricultura para sua subsistência.

Na costa de SC o cultivo do tipo espinhel é o mais utilizado. As ostras são mantidas em lanternas suspensas, presas a um cabo principal, o qual por sua vez é preso a flutuadores. Este tipo de cultivo permite com que as ostras sejam cultivadas em regiões mais abertas e profundas como baías, enseadas e em mar aberto (FERREIRA & NETO, 2006). Desta forma, as ostras ficam sujeitas a diversos tipos de fatores ambientais como variações da temperatura da água, poluentes,

microrganismos patogênicos e inclusive, microalgas nocivas produtoras de toxinas.

1.2 Algas nocivas e ficotoxinas

Florações de algas são fenômenos comuns em ambientes aquáticos. Algumas florações representam ameaças ao ambiente ou à saúde pública e por isso são conhecidas como florações de algas nocivas (FANs) ou popularmente como maré vermelha. Algumas FANs são prejudiciais apenas em virtude de sua biomassa, causando muitas vezes a eutrofização dos corpos hídricos, o que conseqüentemente poderá promover a depleção do oxigênio dissolvido na água, trazendo grandes prejuízos ao ecossistema afetado. Entretanto outras FANs estão associadas com algas capazes de produzir toxinas, denominadas ficotoxinas (BACKER & MCGILLICUDDY, 2006). A contaminação de seres humanos por estas toxinas provocam uma série de sintomas, desde náuseas, vômitos, diarreias até parada respiratória em sua fase aguda, podendo levar a óbito, e em sua fase crônica sintomas de amnésia (FAO, 2004).

As FANs são mundialmente conhecidas por seu forte impacto ecológico e econômico nas regiões costeiras onde ocorrem. Sua ocorrência vem aumentando mundialmente em frequência, intensidade e distribuição geográfica (HALLEGRAEFF, 1993). Para explicar este fenômeno, sugerem-se diferentes hipóteses, como alterações antropogênicas, transferências de moluscos de um local a outro, água de lastro, eutrofização e super-enriquecimento das águas costeiras (HALLEGRAEFF, 2003; 2010).

As FANs podem contaminar os moluscos que as ingerem e incorporar suas toxinas. Como os moluscos servem de alimento para o ser humano, o principal efeito conhecido destas florações é a intoxicação de seu consumidor. Existem inúmeras toxinas produzidas por diferentes espécies de microalgas, sendo que muitas podem ser graves ou até letais para o ser humano (FAO, 2004). Elas podem desencadear diferentes distúrbios fisiológicos em seres humanos, sendo que dentre as atualmente conhecidas estão:

- (a) DSP: do inglês *Diarrhetic Shellfish Poisoning*, causada por toxinas lipossolúveis, como as dinofisistoxinas, produzidas pelos dinoflagelados *Dinophysis* spp. e *Prorocentrum lima*,

- sendo os sintomas mais comuns, diarreia, náusea e dores abdominais;
- (b) ASP: do inglês *Amnesic Shellfish Poisoning*, causada pela ingestão de ácido domóico, produzido principalmente pelas diatomáceas *Pseudo-nitzschia* spp., provocando dores abdominais, vômitos, desorientação e perda de memória (amnésia);
 - (c) PSP: do inglês *Paralytic Shellfish Poisoning*, causada por toxinas paralisantes, sendo a saxitoxina (STX) a mais tóxica, a qual é produzida principalmente pelos dinoflagelados *Alexandrium* sp. Os sintomas variam desde um leve formigamento ou dormência até a completa parada respiratória;
 - (d) NSP: do inglês *Neurotoxic Shellfish Poisoning*, causada por uma toxina neurotóxica conhecida como brevetoxina (PbTx), produzida principalmente pelo dinoflagelado *Karenia brevis*, mas também pela alga bi-flagelada da classe Raphidophyceae, *Heterosigma akashiwo*. Os sintomas incluem náuseas, tonturas, pupilas dilatadas e sensações de formigamento nas extremidades (FAO, 2004).

No presente estudo foram analisadas as microalgas *Alexandrium minutum* e *Heterosigma akashiwo* e suas potenciais ficotoxinas, a saxitoxina (STX) e a brevetoxina (PbTx), cujas características serão detalhadas a seguir.

1.2.1 Saxitoxinas (STXs) e microalgas nocivas do gênero *Alexandrium*

As toxinas que causam PSP compõem um grupo de pequenas moléculas hidrossolúveis, denominadas tetraidropurinas. Dentre estas que são naturalmente produzidas, a STX é considerada a mais tóxica. Os dois grupamentos hidroxilas presentes em um dos anéis que compõem a estrutura da STX (Fig. 1), parecem ser essenciais para a sua toxicidade. Estas toxinas são estáveis mesmo em temperaturas elevadas e em pHs baixos, mas são instáveis e facilmente oxidáveis em pHs alcalinos (FAO, 2004).

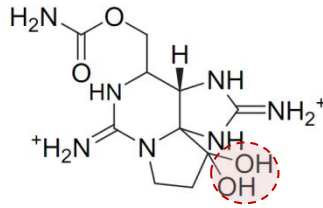


Figura 1. Estrutura química de uma saxitoxina (STX). Em realce, destaca-se o grupo ‘diidroxí’ que confere toxicidade à molécula. Adaptado de KALAITZIS et al. (2010).

Como mencionado anteriormente, as STXs são produzidas principalmente por espécies de dinoflagelados do gênero *Alexandrium*. Este gênero possui ampla distribuição mundial, ocorrendo tanto em regiões do hemisfério norte como nos EUA e na Ásia, quanto no hemisfério sul, como Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (PERSICH *et al.*, 2006). No Brasil já foram registradas florações dos dinoflagelados *A. minutum*, no Rio de Janeiro (MENEZES *et al.*, 2007) e *A. tamarense* no Rio Grande do Sul (PROENÇA, FONSECA & PINTO, 2011). Contudo, estas florações não apresentaram efeitos nocivos aparentes nos animais dessas regiões. Apesar de se terem registros de *A. tamarense* também em regiões de cultivo em SC, não foi possível isolar e confirmar a presença desta espécie no estado (PROENÇA, FONSECA & PINTO, 2011).

Florações de espécies produtoras de STX têm causado mortalidades em massa de peixes e outros animais marinhos (PEARSON *et al.*, 2010), assim como problemas sérios de intoxicação humana em âmbito mundial (PICOT *et al.*, 2011). Nos últimos 20 anos, houve um aparente aumento no número de casos de intoxicação considerados como PSP (FAO, 2004). No Chile, por exemplo, desde 1972, foram registrados 527 casos de PSP sendo que 32 foram fatais (GARCÍA *et al.*, 2004). Não foram encontrados registros destas síndromes paralisantes em humanos no Brasil.

O mecanismo de toxicidade das STXs já foi extensivamente estudado em mamíferos. A STX é um potente bloqueador de canais de sódio voltagem-dependentes presentes nas membranas das células neuronais e junções neuro-musculares (PEARSON *et al.*, 2010). Elas

bloqueiam o influxo de sódio nas células excitáveis, restringindo assim o processo de neurotransmissão.

Uma vez que os bivalves possuem um sistema neuromuscular operado principalmente por canais de cálcio voltagem-dependente, os pesquisadores acreditavam inicialmente que estes não eram afetados por STXs (LANDSBERG, 2002). Apenas recentemente, foi mostrado que essas toxinas podem também afetar os moluscos, causando diversos efeitos como paralisia do músculo adutor, redução na taxa de filtração e captação de alimentos, entre outros, e inclusive episódios de mortalidades (LANDSBERG, 2002).

1.2.2 Brevetoxinas (PbTxs) e a microalga nociva *Heterosigma akashiwo*

As PbTxs, causadoras de NSP, são toxinas lipossolúveis, insípidas, inodoras, estáveis em ácido e temperaturas elevadas. São compostas por poli-éteres cíclicos, com 10 a 11 anéis e cujo peso molecular é de cerca de 900 (FAO, 2004). Elas podem ser subdivididas em dois tipos: tipo A, cuja estrutura é mais flexível e possui 10 anéis poli-éteres fusionados; e tipo B, cuja estrutura é mais rígida e possui 11 anéis poli-éteres. As PbTxs do tipo A são mais tóxicas, porém as do tipo B são sempre encontradas em maior concentração (BRAND, CAMPBELL & BRESNAN, 2011). Ambos os tipos possuem uma cadeia lateral idêntica, que termina em um grupo aldeído α,β -insaturado (Fig. 2) altamente reativo (PLAKAS & DICKEY, 2010).

As PbTxs podem causar grandes mortalidades em aves, peixes e outros animais aquáticos, incluindo mamíferos, através de exposição direta às florações ou indireta através da cadeia alimentar (PLAKAS *et al.*, 2004). Humanos que ingerem moluscos bivalves contaminados com PbTxs podem desenvolver NSP, uma vez que estas ficotoxinas têm a propriedade de se ligar especificamente aos canais de sódio voltagem-dependentes de células excitáveis promovendo assim, sua despolarização (FAO, 2004).

As PbTxs, são produzidas principalmente pelo dinoflagelado marinho *Karenia brevis* sendo a PbTx-2 (Fig. 2), a mais abundantemente produzida por esta espécie e da qual, acredita-se que as outras PbTxs do tipo B são derivadas (PLAKAS & DICKEY, 2010). Porém, recentemente estas neurotoxinas foram também encontradas em outras espécies de microalgas flageladas como, *Chatonella marina*, C.

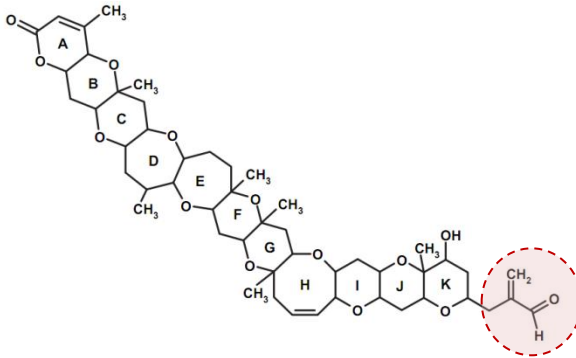


Figura 2. Estrutura química da brevetoxina PbTx-2 (tipo B). Em realce, pode-se observar a cadeia lateral idêntica para os diferentes tipos de PbTxs. Adaptado de PLAKAS et al. (2010).

antiqua, *Fibrocapsa japonica* e *H. akashiwo* (WANG, 2008). KHAN *et al.* (1997) detectaram compostos neurotóxicos análogos à PbTx em uma grande floração da raphidophyceae *H. akashiwo* no Japão, correspondente a PbTxs, durante a qual observou-se paralisia reversível em peixes juvenis (baixa densidade de algas), além de uma grande mortalidade de peixes (alta densidade de algas). Floresções de *H. akashiwo* são frequentemente observadas em águas costeiras em todo o mundo, sendo que nos últimos anos se observou um aumento em sua incidência e distribuição mundial. Estas florações são responsáveis pela mortalidade massiva em nível mundial de peixes cultivados e em menor escala de peixes selvagens, inclusive no Brasil, como registrado na Baía de Paranaguá – PR (PROENÇA, 2006). *H. akashiwo* já foi responsável pela mortalidade de peixes em cultivos no Japão, China, Coreia, Noruega, Canadá, Chile, Nova Zelândia e EUA (O'HALLORAN *et al.*, 2006). Por estas razões, *H. akashiwo* tornou-se objeto de crescente interesse entre pesquisadores e os aquicultores (LING & TRICK, 2010). Em SC, já ocorreram dois eventos de florações de *H. akashiwo*, sendo um em 2002 e outro em 2007, porém não foram registradas mortalidades de peixes (PROENÇA, FONSECA & PINTO, 2011).

Não foram observadas mortalidades em bivalves expostos a microalgas produtoras de PbTxs até o momento, porém, pouquíssimos estudos avaliaram se ocorrem efeitos sub-letais destas toxinas nestes animais (KEPPLER *et al.*, 2006; LEVERONE *et al.*, 2006).

1.3 Efeito de microalgas nocivas e suas ficotoxinas em bivalves

Como os bivalves são diretamente expostos às microalgas nocivas e suas toxinas, uma vez que são organismos sésseis, filtradores e se alimentam destas algas, vários estudos já demonstraram modificações de suas respostas fisiológicas por ocasião destas florações (vide revisões de SHUMWAY, 1990; LANDSBERG, 2002). No entanto, as FANs são majoritariamente analisadas apenas no contexto da intoxicação de consumidores humanos ou ainda no contexto ecológico, no caso do comprometimento de populações de peixes, aves e da cadeia alimentar na qual estes organismos estão inseridos (vide revisão de LANDSBERG, 2002). Além disso, é senso comum achar que estas florações não trazem grandes problemas à saúde dos bivalves, incluindo aqueles cultivados. Esta crença é baseada no fato de que estes apresentam mortalidades esporádicas durante estes episódios, e que, portanto, basta aguardar sua depuração após a passagem da floração, para que seu consumo seja liberado.

Contudo, estudos mais recentes vêm demonstrando diversos efeitos das FANs em organismos aquáticos, incluindo bivalves. Esses efeitos são extremamente variáveis, sendo dependentes da espécie de bivalve afetada e da espécie da alga nociva responsável pela floração e de suas toxinas. No entanto, a maioria dos estudos realizados tem avaliado uma gama restrita de efeitos, como a abertura e fechamento de valvas, taxas de filtração, índice de condição e produção de pseudofeces (vide revisões de SHUMWAY, 1990; LANDSBERG, 2002). Apenas muito recentemente alguns estudos vêm se interessando pelo efeito destas florações no sistema imune dos bivalves e em suas células imunocompetentes ou hemócitos (DIZER *et al.*, 2001; CARVALHO PINTO-SILVA *et al.*, 2003; CARVALHO PINTO-SILVA, CREPPY & MATIAS, 2005; HÉGARET & WIKFORS, 2005a; b; HÉGARET, DA SILVA *et al.*, 2007; HÉGARET, SHUMWAY & WIKFORS, 2007; HÉGARET, WIKFORS *et al.*, 2007; DA SILVA, HÉGARET *et al.*, 2008; FORD *et al.*, 2008; GALIMANY, SUNILA *et al.*, 2008a; b; WIKFORS *et al.*, 2008; HABERKORN *et al.*, 2009; HÉGARET *et al.*, 2009; HÉGARET *et al.*, 2010; MELLO, PROENÇA & BARRACCO, 2010; HÉGARET *et al.*, 2011).

O conhecimento ainda muito insuficiente do efeito de microalgas nocivas e de suas ficotoxinas sobre o sistema imunológico de bivalves é um fator limitante para o estabelecimento de estratégias de proteção para espécies cultivadas, como a ostra *C. gigas*, uma vez que,

apesar das FANs não estarem normalmente associadas a eventos de mortalidade, elas podem comprometer o estado de saúde desses animais, deixando-os mais suscetíveis a infecções por microorganismos patogênicos ou oportunistas ou a outros fatores ambientais.

1.4 Sistema imune e sistemas de defesa associados em bivalves

O sistema imune dos bivalves está restrito a uma imunidade inata ou natural, diferentemente dos vertebrados que possuem além deste, uma imunidade adaptativa que inclui uma infinidade de receptores e anticorpos altamente específicos e células de memória. O sistema de defesa dos bivalves está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa, onde existem células circulantes chamadas hemócitos, responsáveis pelas reações imune celulares e uma variedade de proteínas plasmáticas relacionadas às respostas imune humorais. Ambas as reações atuam de forma integrada, protegendo os moluscos contra infecções e garantindo sua homeostase (vide revisões de BARRACCO & DA SILVA, 2008; SONG *et al.*, 2010). A fagocitose de microrganismos invasores, a formação de nódulos e cápsulas em torno de patógenos e sua posterior degradação por mecanismos líticos e degradativos constituem as principais respostas imunes celulares realizadas pelos hemócitos. Já os fatores humorais incluem proteínas de reconhecimento capazes de identificar padrões moleculares específicos presentes na superfície dos patógenos (do inglês, PRP: *pattern recognition proteins* e PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*) e uma série de moléculas imunofetoras que levam a neutralização ou destruição dos patógenos invasores (vide revisões de BARRACCO & DA SILVA, 2008; SONG *et al.*, 2010).

Dentre algumas moléculas imunofetoras já descritas em bivalves, podemos destacar as defensinas, a BPI (do inglês *bactericidal/permeability-increasing protein*), a interleucina-17 (IL-17), a EcSOD (do inglês *extracellular superoxide dismutase*) e a peroxiredoxina 6 (Prx6). As defensinas (Defh1 e Defh2) são peptídeos antimicrobianos produzidos pelos hemócitos com atividade potente contra bactérias Gram (+), e em menor escala contra Gram (-) e fungos filamentosos (GUEGUEN *et al.*, 2006; GONZALEZ, GUEGUEN, DESSERRE *et al.*, 2007). A BPI também corresponde a uma proteína bactericida, aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana e levando ao seu extravasamento celular. Esta proteína pode ser induzida em hemócitos de ostras mediante desafio com bactérias (GONZALEZ,

GUEGUEN, DESTOUMIEUX-GARZON *et al.*, 2007). A IL-17 é uma citocina semelhante à IL-17 de vertebrados, cujo primeiro relato de ocorrência em um invertebrado foi em *C. gigas* e cuja expressão é induzida nos hemócitos após desafio com bactérias (ROBERTS *et al.*, 2008). Outra possível proteína regulatória já descrita em *C. gigas* é a Prx6. Esta enzima apresenta apenas um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e está envolvida no metabolismo de peróxidos (DAVID, TANGUY & MORAGA, 2007). Porém, estudos recentes com vertebrados e invertebrados (helmintos) sugerem ainda que as peroxidoxinas assumam também um importante papel no sistema imune desses animais, atuando como uma via alternativa de ativação das células de defesa (ROBINSON *et al.*, 2010). A EcSOD é uma proteína com atividade de superóxido dismutase, que possui ainda a propriedade de se ligar a lipopolissacarídeos (LPS) presentes na superfície de bactérias Gram (-). Acredita-se ainda que a EcSOD atue também como opsonina, ligando-se às integrinas das membranas dos hemócitos (GONZALEZ *et al.*, 2005), potencializando assim, o reconhecimento e eliminação destas bactérias através da fagocitose.

Um importante mecanismo de destruição de patógenos invasores refere-se à produção de moléculas tóxicas e microbicidas como as espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são moléculas muito instáveis que normalmente contêm um ou mais elétrons desemparelhados reagindo rapidamente com estruturas celulares e moléculas próximas como membranas, DNA e proteínas do metabolismo celular danificando suas funções (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). A produção de ERO é estimulada durante a fagocitose e encapsulamento de microrganismos ou parasitas invasores pelos hemócitos e é também conhecida como choque respiratório. Esta produção inicia-se com a ativação de um sistema enzimático, denominado NADPH oxidase, que está associado às membranas dos fagócitos e também na membrana lisossomal e catalisa a redução do oxigênio molecular para ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este, por sua vez, pode ser convertido espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, sob a ação da enzima mieloperoxidase e em presença de cloro, pode gerar o ácido hipocloroso (HOCl) que também é um agente microbicida potente. Além destes compostos, podem ainda ser geradas outras ERO, como o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o oxigênio singlet (O_2^1) que também apresentam efeitos citotóxicos e microbicidas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Paralelamente a sua ação microbicida potente, estes oxiradicais, podem também causar danos importantes nos tecidos do próprio hospedeiro. Para neutralizar este efeito, existem mecanismos de defesa antioxidantes que atuam na eliminação das ERO ou na transformação destes radicais em produtos menos tóxicos.

As defesas antioxidantes podem ser do tipo não-enzimáticas, representadas pelas vitaminas C e E, flavonóides, o tripeptídeo glutationa (GSH), entre outros, e enzimáticas. Dentre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima que age sobre o radical O_2^- dismutando-o a H_2O_2 e a glutationa peroxidase (GPx), uma seleno-proteína a qual possui atividade peroxidásica contra H_2O_2 e peróxidos orgânicos. Por outro lado, as peroxiredoxinas (Prxs), compõem um conjunto de enzimas que catalisam a remoção de peróxidos, mas diferentemente da GPx, seu mecanismo catalítico envolve cisteínas reativas, e não o selênio como na GPx. A glutationa S-transferase (GST) é responsável pela conjugação de compostos xenobióticos eletrofilicos à GSH, reduzindo sua toxicidade, aumentando sua hidrofiliabilidade e permitindo a eliminação destes conjugados para o meio extracelular através de sistemas de transporte. Com base nas seqüências de aminoácidos, propriedades enzimáticas e estrutura quaternárias, as GSTs podem ser divididas em inúmeras classes, designadas alpha, kappa, mu, pi, sigma, omega, theta e zeta (SHEEHAN et al., 2001). Em *C. gigas* já foram identificadas seqüências de cDNA das GSTs das classes pi, mu, ômega e sigma (BOUTET et al., 2004a), assim como as seqüências da Cu/Zn-SOD (BOUTET et al., 2004b), Cu/Zn-EcSOD (GONZALEZ et al., 2005) e GPx (JO et al., 2008).

As GSTs são as principais enzimas de biotransformação de fase II, as quais comumente podem utilizar substratos catalisados por enzimas de biotransformação de fase I. A fase I é caracterizada pela atividade de enzimas da família dos citocromos P450. Estas enzimas possuem a capacidade de metabolizar uma grande variedade de substratos, incluindo moléculas endógenas, como ácidos graxos e esteróides, e xenobiontes, como hidrocarbonetos, pesticidas e drogas (SNYDER, 2000). Em *C. gigas* foi identificada apenas uma isoforma de citocromo, o CYP356A1 por abordagem molecular (TOLEDO-SILVA et al., 2008). Esta isoforma pôde ser induzida em ostras *C. gigas* expostas a esgoto doméstico, sugerindo seu envolvimento na biotransformação de xenobiontes neste bivalve (MEDEIROS et al., 2008).

Outra proteína, possivelmente envolvida em processos de detoxificação é a FABP (do inglês, *fatty acid binding protein*). A FABP é uma pequena molécula citosólica com afinidade para compostos hidrofóbicos. Apesar de suas funções ainda não estarem completamente elucidadas, acredita-se que ela esteja envolvida na captação e transporte de ácidos graxos (ESTEVES & EHRLICH, 2006). Contudo, esta molécula pode estar também associada ao metabolismo de xenobiontes, uma vez que VELKOV *et al.* (2005) descreveram que a FABP possui alta afinidade com drogas lipofílicas e MEDEIROS *et al.* (2008) observaram uma indução do seu gene em ostras expostas a esgoto doméstico.

Outra proteína já descrita em *C. gigas* por abordagem molecular é a Hsp70 (do inglês *heat shock protein*) (BOUTET *et al.*, 2003). Esta molécula pertence à família de proteínas de choque térmico, altamente conservadas, que auxiliam no enovelamento de proteínas. A Hsp70 é uma proteína ubíqua associada a diferentes fatores de estresse, como o estresse térmico (MEISTERTZHEIM *et al.*, 2007) e também infecções (TIRARD *et al.*, 1995; ENCOMIO & CHU, 2005; CELLURA *et al.*, 2007).

Tendo em vista as várias sequências de cDNA disponíveis em *C. gigas* a partir de bancos virtuais, selecionamos algumas destas sequências que codificam proteínas associadas a diferentes mecanismos de defesa, a fim de avaliar sua expressão em hemócitos de ostras expostos à ficotoxinas e microalgas nocivas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito *in vitro* das microalgas nocivas *Alexandrium minutum* e *Heterosigma akashiwo* e de duas ficotoxinas purificadas, a saxitoxina e a brevetoxina (PbTx-2), em hemócitos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas*.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Determinar funções celulares de hemócitos de *C. gigas* expostos *in vitro* à *A. minutum* e à saxitoxina, como tamanho, complexidade interna, viabilidade, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio;
- ✓ Estimar a viabilidade de hemócitos de *C. gigas* expostos *in vitro* à produtos extracelulares de *H. akashiwo* e à brevetoxina PbTx-2;
- ✓ Estimar a porcentagem de hemócitos apoptóticos de *C. gigas* após exposição *in vitro* à PbTx-2;
- ✓ Determinar a expressão quantitativa de genes associados ao sistema imune, antioxidante e ao estresse (BPI, IL-17, Defh2, EcSOD, Prx6, GPx, SOD, Hsp70) e à detoxificação (CYP356A1, GSTO, FABP) em hemócitos de *C. gigas* expostos *in vitro* à *A. minutum*, saxitoxina e PbTx-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Dois tipos de observações foram realizadas neste trabalho: *Estudo 1* – efeito da microalga nociva *Alexandrium minutum* e da saxitoxina (STX) purificada e, *Estudo 2* – efeito da microalga *Heterosigma akashiwo* e da brevetoxina (PbTx-2) purificada nos hemócitos de ostras adultas *Crassostrea gigas*.

3.1 *Estudo 1* – Efeito *in vitro* do dinoflagelado *A. minutum* e da saxitoxina (STX) em hemócitos de ostras *C. gigas*

3.1.1 *Material Biológico*

Ostras adultas foram obtidas na baía de *Brest, Le Dellec, Plouzané*, França. Antes de sua utilização nos experimentos, as ostras foram aclimatadas durante um período mínimo de 2 semanas e mantidas em água do mar filtrada corrente (AMFE – filtro de 1 µm) a 11 °C. Durante a aclimação, as ostras foram alimentadas com as microalgas *Isochrysis* sp. (cepa T-iso) e *Pavlova* sp.

As culturas não axênicas de *A. minutum* Halim, 1960 (cepa AM89BM, isolada em 1989 na baía de *Morlaix*, Bretanha, França) foram cultivadas em AMFE, suplementada com meio L1 (GUILLARD & HARGRAVES, 1993) e mantidas a 16 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12:12 h escuro/claro, sendo utilizadas em fase exponencial de crescimento, após 12 dias de cultura.

3.1.2 *Extração de hemolinfa*

A hemolinfa das ostras foi extraída do músculo adutor através da inserção de uma agulha 0,80x30 mm acoplada a uma seringa estéril de 1 mL, após realizar uma pequena abertura nas valvas dos animais próxima ao músculo. Uma gota de cada hemolinfa recém extraída foi observada ao microscópio óptico para avaliar a presença de impurezas (falha na extração) e, uma vez confirmada a qualidade da hemolinfa, esta era mantida em gelo até o momento de uso.

3.1.3 Desenho experimental

A hemolinfa das ostras *C. gigas* foi preparada sob forma de 3 *pools* de 10-12 animais (N=3). As concentrações de hemócitos (tamanho médio celular = 10 μm) de cada *pool* foi estimada por citometria de fluxo, enquanto que a concentração de *A. minutum* foi estimada com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Para as análises de citometria, 100 μL de cada *pool* de hemolinfa ($\approx 3,5 \cdot 10^5$ células/mL) foram incubados com 300 μL de cultura de *A. minutum* ($2 \cdot 10^4$ células/mL) (tamanho médio celular = 23 μm). A densidade de algas comparada com a dos hemócitos foi de aproximadamente 6 hemócitos por célula de alga e a relação volume hemolinfa/cultura de algas foi de 1:3. Um volume igual (100 μL) dos mesmos *pools* de hemolinfa foi também incubado com 300 μL de 0,05 $\mu\text{g/L}$ de STX (Abraxis, Columbia Analytical Services, Inc.) (concentração final 0,0375 $\mu\text{g/L}$ em AMFE).

Para as análises de expressão gênica, foram utilizadas as mesmas concentrações de hemócitos, microalgas e ficotoxina, porém na proporção de 1:1 (6 mL de hemolinfa : 6 mL cultura de *A. minutum* ou de STX purificada), obtendo-se portanto uma proporção de cerca de 17 hemócitos por célula de alga e uma concentração final de 0,025 $\mu\text{g/L}$ de STX.

Em todos os tratamentos, as suspensões de hemócitos foram incubadas em tubos de citometria ou tubos Falcon de 15 mL por 4 h, a 18 °C, no escuro. Nos controles, os hemócitos foram incubados apenas em AMFE.

3.1.4 Análises de citometria de fluxo

Após a incubação dos hemócitos com a cultura da microalga *A. minutum* ou com a STX purificada, as amostras foram filtradas (malha de 80 μm) e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para a caracterização e análise de algumas funções dos hemócitos.

3.1.4.1 Caracterização dos hemócitos

A caracterização dos hemócitos foi realizada avaliando-se o seu tamanho, através do detector FSC (*Forward Scatter*), e a sua

complexidade interna, através do detector SSC (*Side Scatter*) (HÉGARET, WIKFORS & SOUDANT, 2003a).

3. 1.4.2 Viabilidade dos hemócitos

A viabilidade celular foi avaliada através de dupla marcação com SYBR Green I (Invitrogen), o qual marca o DNA de todas as células e com o iodeto de propídeo (IP) (Sigma), o qual marca apenas as células mortas. Para tal, após a incubação dos hemócitos com a saxitoxina ou culturas de *A. minutum*, uma alíquota das amostras (150 µL) de cada tratamento foi incubada com IP numa concentração final de 10 µg/mL e SYBR Green I numa diluição final de 10^{-2} , por 1 h, no escuro, a 18 °C. Determinou-se então o percentual de hemócitos marcados com IP, em relação ao número total de hemócitos (HÉGARET, WIKFORS & SOUDANT, 2003b).

3. 1.4 .3 Fagocitose

O índice fagocítico dos hemócitos foi analisado incubando-se 100 µL das amostras com 30 µL de microesferas fluorescentes (*Fluoresbrite YG microspheres*, 2,00 µm, Polysciences) a 2,5 % em água destilada e 200 µL de AMFE (filtrada a 22 µm) por 1 h, no escuro, a 18 °C. Foi então determinado o percentual de hemócitos altamente fagocíticos (que fagocitaram 3 ou mais esferas) (HÉGARET, WIKFORS & SOUDANT, 2003b).

3. 1.4 .4 Produção de EROs

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos hemócitos foi avaliada usando-se o reagente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA – Sigma). Para tal, um volume de 100 µL das amostras foi incubado com 4 µL de DCFH-DA numa concentração final de 10 µg/mL e 300 µL de AMFE por 2 h, no escuro, a 18 °C (HÉGARET, WIKFORS & SOUDANT, 2003b).

3.1.5 Análises de expressão gênica

3.1.5.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Ao final das 4 h de incubação dos hemócitos com a cultura de *A. minutum*, com a STX ou AMFE (controle), as amostras foram centrifugadas (1.000 g, 10 min, 4 °C) e as células resuspensas em RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) e armazenadas até o momento de uso. A extração do RNA das amostras foi realizada com o reagente TRIzol[®] (Invitrogen). A seguir as amostras foram tratadas com DNase I (Fermentas) e a pureza e concentração de RNA foram avaliadas espectrofotometricamente com o aparelho NanoVue[®] (GE Healthcare, Suécia). Para a síntese de cDNA foram utilizadas apenas amostras de RNA com razão de absorvância (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 e 2,1. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 250 ng de RNA total utilizando a enzima RevertAid[®] Reverse Transcriptase (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, juntamente com 0,5 µg do iniciador oligo(dT)₁₈ (Fermentas) e 20 U de RiboLock[™] RNase Inhibitor (Fermentas).

3.1.5.2 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Os cDNAs obtidos foram utilizados para análises de qPCR com o objetivo de determinar a expressão relativa de mRNA de onze proteínas: BPI, IL-17, Defh2, EcSOD, Prx6, Hsp70, GPx, SOD, GSTO, FABP e CYP356A1. Alguns iniciadores (EcSOD, Prx6, GPx, SOD) não obtidos de estudos prévios, foram desenhados a partir de sequências específicas dos genes correspondentes de *C. gigas* depositadas no GenBank, de acordo com as seguintes características: tamanho entre 18-20 pb, T_m entre 59-61 °C, conteúdo de GC entre 40-60 % e tamanho do fragmento amplificado entre 90-200 pb. As sequências e números de acesso ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) estão listados na Tabela 1. A eficiência de cada par de iniciadores foi testada utilizando-se o método da curva padrão. Para tal, foi feita uma diluição seriada (1:3, 1:7, 1:15, 1:31, 1:63) de uma única amostra de cDNA composta por um *pool* de todos os cDNAs obtidos a partir dos diferentes tratamentos. Só foram utilizados iniciadores que apresentaram eficiência entre 1,8 e 2,2. As análises de qPCR foram realizadas em microplacas de 96 poços, em duplicata, através do termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), com um volume total de reação de 10 µL. Cada reação continha 5 µL de Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas), 0,3 µM de cada iniciador e 1 µL de cada cDNA diluído (1:3). As condições de amplificação foram 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. A especificidade do produto da

qPCR foi analisada através de uma curva de dissociação realizada após a amplificação, observando-se um único pico na T_m esperada. Os resultados foram expressos como expressão relativa dos transcritos normalizados através do gene de referência gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH; Tabela 1), utilizando-se o método do $2^{-(\Delta\Delta ct)}$ (PFAFFL, 2001).

3.1.6 Estatística

A análise dos dados foi realizada no software STATISTICA 7 (StatSoft®, EUA), utilizando a análise de variância de 1 via, seguido do teste *post hoc* de Duncan. Para a quantificação da viabilidade, fagocitose e produção de ERO os dados (porcentagens) foram transformados para arcoseno. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 3. Genes selecionados, sequência dos iniciadores utilizados para as análises de qPCR e números de acesso no GenBank.

Gene	Sequência 5'– 3'	GenBank
<i>GAPDH</i>	Fw - GCTGTGACACCATTGGAGAA Rv - ACCAATGACGCAACAAGCGA	AJ544886.1
<i>Prx6</i>	Fw - GAGCCAGAGTTCAAGAAGAG Rv - TGCATTGTCCTTTTCGGCTG	AM265552.1
<i>IL-17</i>	Fw – ACTGAGGCTCGATGCAAGTG Rv - AGCCTTCTTGCTTCATGTGG	EF190193.1
<i>BPI</i>	Fw – GATAGAAATAGGAATGGACGG Rv - GTTATAGATCCACGCTGCTCC	HM992925.1
<i>Defh2</i>	Fw - TTTCGCTGGATTTGGGTGTC Rv - TGGTCAGATTGACTGGTC	DQ400102.1
<i>Hsp70</i>	Fw – TCATCAAGTGGATGGACCAG Rv - CATTCCTCCAGGCATGCCA	AB122063.1
<i>EcSOD</i>	Fw – GCTGTGACACCATTGGAGAA Rv - ACCAATGACGCAACAAGCGA	DQ010420.1
<i>GSTO</i>	Fw - TGATGAGTTCACCACCGCAA Rv - TTCAAACCATGGCCACAGCA	AJ557141.1
<i>CYP356A1</i>	Fw - ATGAAACCCGCGAAACCAGA	EF645271.1

	Rv - TAAATTCGGCTTCACGCCCT	
SOD	Fw - TCAACAAAGAGCATGGCGTC	AJ496219.1
	Rv - TTTCCGGTCGCTTACTGAG	
GPx	Fw - TCAAGATCCGAGATGTCGTC	EF692639.1
	Rv - ACTCGGTTCCAGACATGAG	

3.2 Estudo 2 - Efeito *in vitro* da microalga *H. akashiwo* e da brevetoxina purificada (PbTx-2) em hemócitos de ostras *C. gigas*

3.2.1 Material biológico

Ostras adultas foram obtidas da Fazenda Marinha Atlântico Sul, localizada na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, região de Ribeirão de Ilha, município de Florianópolis (SC). Antes de sua utilização nos experimentos, as ostras foram aclimatadas durante um período mínimo de 2 semanas e mantidas em água do mar filtrada (AMFE – filtro de 1 µm) a 18-20 °C. Durante esse período as ostras foram alimentadas com microalgas *Tetraselmis* sp.

As culturas não axênicas de *H. akashiwo* (Hada) Hada ex Sournia (cepa OL, isolada em 1973 no cabo de *New York, New Jersey*, EUA) foram cultivadas em AMFE, suplementada com meio F/2 (GUILLARD, 1975) e mantidas a $18 \pm 0,5$ °C, com fotoperíodo de 12:12 h escuro/claro. As microalgas foram utilizadas em fase exponencial de crescimento, após 4-5 dias de cultura.

3.2.2 Desenho experimental

A hemolinfa das ostras extraída sob forma de 3-5 *pools* de 6-30 animais (N=3-5) (vide item 3.1.2) foi centrifugada a 300 g, por 10 min, a 4 °C. O plasma foi descartado e os hemócitos ressuspensos em água do mar filtrada estéril (AMFE - 0,22 µm), na concentração final de 10^6 células/mL. As suspensões de hemócitos foram então incubadas em tubos de citometria com 3, 30, 100, 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2 (World Ocean Solutions), purificada do dinoflagelado *Karenia brevis*, previamente solubilizada com DMSO (concentração final de até 0,05 %) durante 1, 4 e 12 h a 18 °C, no escuro. Nos controles, os hemócitos foram incubados apenas em AMFE contendo 0,01 ou 0,05 % de DMSO.

Após a incubação, foram avaliados a viabilidade (MTT e VN), o índice apoptótico e a expressão gênica dos hemócitos (Tabela 2).

As suspensões de hemócitos foram ainda incubadas com os produtos extracelulares (PECs) da microalga *H. akashiwo* (tamanho médio celular = 15 µm). Os PECs foram obtidos a partir de duas culturas da microalga, ambas na concentração de 1.10^5 células/mL, estando a primeira em fase exponencial de crescimento (PEC1) e a segunda em fase de declínio (PEC2). Os PECs (1 e 2) foram obtidos segundo o protocolo descrito por DA SILVA *et al.* (2008), através de sucessivas centrifugações à baixa velocidade (300 g, 5 min, 18 °C) e uma última à alta velocidade (12.000 g, 10 min, 18 °C) para eliminação das células algais. As suspensões de hemócitos foram, então, tratadas com o sobrenadante (desprovido de algas), contendo apenas produtos excitados (PEC) pela microalga viva ou pelo rompimento de microalgas mortas durante o período de cultivo por 4 h a 18 °C, no escuro. Nos controles, os hemócitos foram tratados apenas com o meio de cultura das algas (filtrado estéril). Após incubação, os hemócitos foram avaliados quanto a sua viabilidade pelos ensaios do MTT e VN.

3.2.3 Determinação da viabilidade dos hemócitos através do ensaio do MTT e vermelho neutro (VN)

Após a incubação dos hemócitos (3-4 *pools* de 6-30 animais) por 1, 4 e 12 h com 3, 30, 100, 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2, os PECs de *H. akashiwo*, ou apenas AMFE (controle), a viabilidade dos hemócitos foi estimada pelos ensaios do MTT e VN (adaptado de TREVISAN *et al.*, 2012).

Para o ensaio do MTT, 600 µL das amostras de cada tratamento (6×10^5 células) foram centrifugadas (800 g, 10 min, 4 °C) e ressuspensas em 300 µL brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a 0,5 mg/mL (em PBS marinho, contendo NaCl 3 %) por 1 h, no escuro, a temperatura ambiente. As suspensões foram então novamente centrifugadas (1.000 g, 10 min, 4 °C), o sobrenadante removido e o formazan produzido pela redução do MTT foi solubilizado com 200 µL DMSO. As diferentes amostras foram então transferidas para uma microplaca de 96 poços e a absorbância medida em 550 nm em uma leitora de placas TECAN. As análises foram realizadas em triplicatas.

Para o ensaio do VN, de forma semelhante ao descrito acima, 300 µL das amostras (3×10^5 hemócitos) foram centrifugadas (800 g, 10

min, 4 °C), ressuspensas em 150 µL de VN 0,004 % (em PBS marinho) e incubadas por 3 h, no escuro, a 18 °C. As células foram então lavadas com 500 µL de PBS marinho, centrifugadas (800 g, 10 min, 4 °C) e após ressuspensas em 200 µL de álcool etílico acidificado (50 % etanol, 1 % ácido acético) para liberação do corante. As diferentes amostras foram então transferidas para uma microplaca de 96 poços e a absorbância medida a 560 nm em uma leitora de placas TECAN. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.2.4 Determinação da porcentagem de hemócitos apoptóticos e/ou apresentando micronúcleo

A porcentagem de hemócitos apresentando núcleos alterados, com características semelhantes a apoptose e/ou apresentando estruturas semelhantes a micronúcleos foi avaliada após incubação dos hemócitos (3 *pools* de 6-7 animais) com 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2 ou AMFE (controle), por 12 h. Após incubação, as suspensões de hemócitos (500 µL) (5.10^5 células/mL) foram centrifugadas (800 g, 10 min, 4 °C), fixadas em formaldeído 4 % em PBS (200 µL) e utilizadas para preparar esfregaços celulares. Os esfregaços foram então imersos em tampão Mc Ilvane (ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,4 M) por 5 min e tratados com uma solução do corante fluorescente de Hoechst em tampão Mc Ilvane (80 ng/mL) por aproximadamente 3-5 min. Os esfregaços foram então montados com lamínulas e observados ao microscópio de fluorescência (excitação 365 nm). Foram analisadas 100 estruturas nucleares por amostra em triplicata.

3.2.5 Análises de expressão gênica

Após incubação por 4 h com diferentes concentrações de PbTx-2 (300 e 1.000 µg/L) ou AMFE (controle), as suspensões de hemócitos (5 *pools* de 5-9 animais) foram utilizadas para extração de RNA e síntese de cDNA, como descrito acima (item 3.1.5). Os genes analisados também foram os mesmos descritos anteriormente.

3.2.6 Estatística

A análise dos dados foi realizada no software STATÍSTICA 7 (StatSoft®, EUA), utilizando a análise de variância de 2 vias, no caso dos ensaios de viabilidade com a PbTx-2 e de 1 via, no caso da

quantificação da apoptose e expressão gênica, seguido do teste *post hoc* de Duncan. Para a quantificação da apoptose os dados (porcentagens) foram transformados para arco-seno. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 4. Parâmetros analisados em cada estudo. *Estudo 1* – efeito da microalga nociva *Alexandrium minutum* e da saxitoxina (STX) purificada e, *Estudo 2* – efeito da microalga *Heterosigma akashiwo* e da brevetoxina (PbTx-2) purificada, sobre os hemócitos de ostras *Crassostrea gigas*.

Parâmetros analisados	<i>Estudo 1</i>	<i>Estudo 2</i>
Tamanho e complexidade	✓	
Fagocitose	✓	
Produção de ERO	✓	
Viabilidade (IP)	✓	
Viabilidade (VN e MTT)		✓
Apoptose		✓
qPCR	✓	✓

4. RESULTADOS

4.1 *Estudo 1 - Efeito in vitro do dinoflagelado Alexandrium minutum e da saxitoxina (STX) em hemócitos de ostras Crassostrea gigas*

4.1.1 *Citometria de fluxo*

Como esperado, experimentos preliminares confirmaram que as algas não apresentavam atividade fagocítica para as microesferas fluorescentes e para os hemócitos da ostra, o que poderia ter confundido a análise dos citogramas produzidos pela citometria de fluxo.

Através das análises de citometria de fluxo e do gráfico SSC vs FSC foram observadas duas populações de hemócitos (Fig. 3A). A maior parte das células era mais diversa em tamanho e complexidade, correspondente aos hemócitos hialinos (HH) e a outra parte, aparentemente menor em quantidade, eram células mais complexas, correspondente aos hemócitos granulares (HG). Os hemócitos foram diferenciados dos restos celulares ou outras partículas presentes na hemolinfa através da marcação com fluorescência do SYBR Green, detectada no canal FL1 (fluorescência verde) (Fig. 3B). Os hemócitos incubados com as culturas de *A. minutum* (Fig. 3C) foram diferenciados das células algais analisando-se a fluorescência emitida pelos cloroplastos através do canal FL3 (fluorescência vermelha) (Fig. 3D). Além disso, por serem maiores e mais complexas as células algais eram facilmente observadas no gráfico SSC vs FSC e também puderam ser selecionadas e eliminadas em outros gráficos de análises (fagocitose, ROS, etc.).

A taxa de fagocitose foi avaliada apenas em hemócitos que fagocitaram 3 ou mais microesferas, o que pôde ser avaliado a partir de um histograma do canal FL1, selecionando-se a região a partir do terceiro pico de fluorescência. O primeiro pico corresponde a hemócitos que fagocitaram apenas uma microesfera, o segundo corresponde a hemócitos que fagocitaram duas microesferas e assim por diante (Fig. 4).

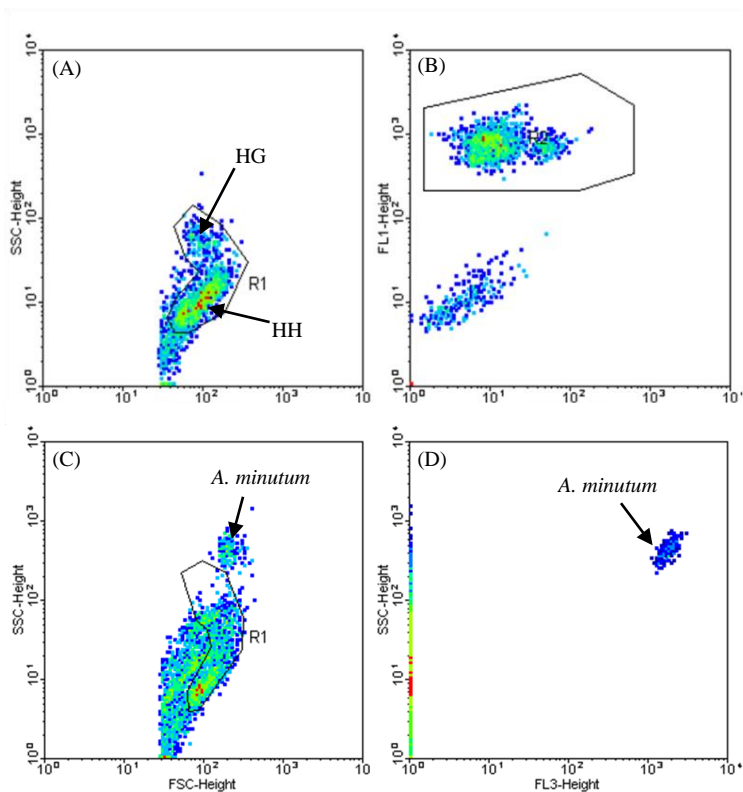


Figura 3. Citogramas de densidade mostrando (A) populações de hemócitos ou (C) hemócitos mais as células de *A. minutum*, em função de seu tamanho (Forward Scatter-FSC) ou complexidade (Side Scatter-SSC), (B) intensidade de fluorescência verde (FL1) evidenciando as partículas contendo DNA marcado com SYBR Green (hemócitos), ou (D) intensidade de fluorescência vermelha (FL3) evidenciando as microalgas. HG = hemócitos granulares e HH = hemócitos hialinos.

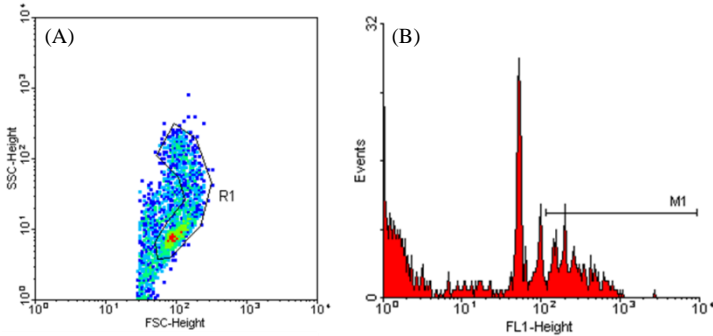


Figura 4. (A) Citograma de densidade e (B) histograma de fluorescência (FL1) de amostras de hemócitos incubados com microesferas fluorescentes para a análise da taxa de fagocitose. R1 = região correspondente aos hemócitos. O histograma representa somente a população selecionada pela R1 e M1 corresponde aos hemócitos que fagocitaram três ou mais microesferas.

Tanto os HH quanto os HG da ostra *C. gigas* não mostraram alteração de sua complexidade após 4 h de incubação com a alga *A. minutum* ou com a STX (Fig. 5A). Contudo, os HG apresentaram um leve aumento de tamanho (33 %) quando expostos a microalga *A. minutum*, mas não à STX em relação aos incubados apenas com AMFE (Fig. 5B).

Os hemócitos expostos à microalga *A. minutum* ou a STX não apresentaram uma variação na sua viabilidade quando comparados aos hemócitos controle, incubados com AMFE (Fig. 5C).

Interessantemente, a atividade fagocítica dos hemócitos diminuiu significativamente em cerca de 30 % após exposição à microalga *A. minutum* ou à STX (Fig. 5D).

A produção de ERO, tanto nos HH quanto nos HG, foi marcadamente reduzida após incubação com *A. minutum* ou STX (Fig. 5E). Os HH apresentaram uma diminuição de 38 e 72 %, nos tratamentos com a microalga e a toxina, respectivamente. Para os HG essa diminuição foi ainda maior, correspondendo a aproximadamente 80 % em ambos os tratamentos.

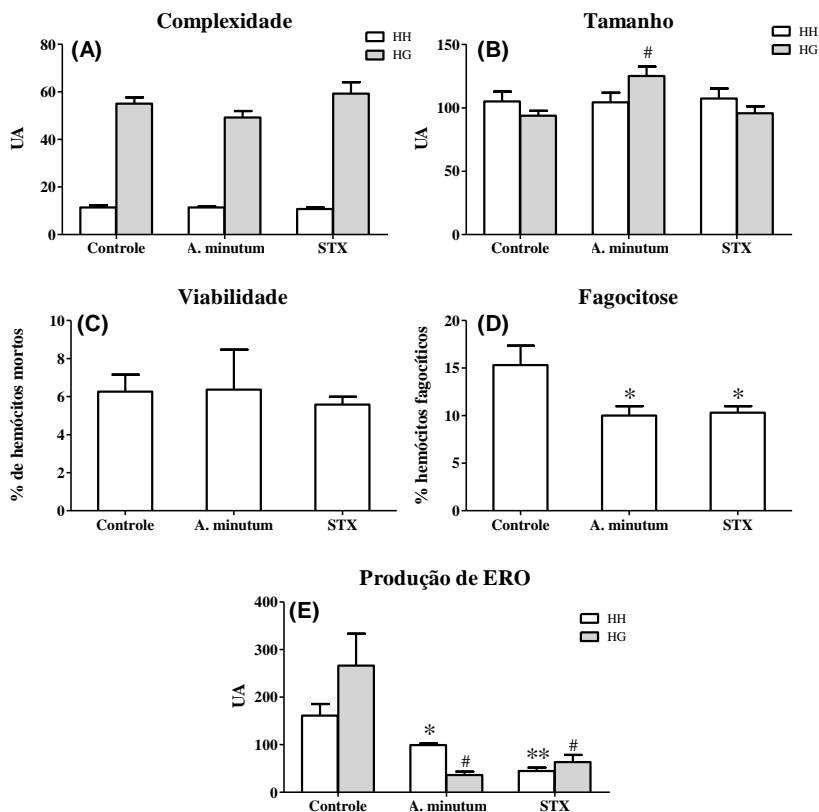


Figura 5. Análises em citometria de fluxo dos hemócitos da ostra *Crassostrea gigas*, incubados com a alga nociva *Alexandrium minutum* (1:6, alga/hemócito) ou com saxitoxina (STX – 0,0375 µg/L), durante 4 h. Controle - hemócitos incubados apenas em água do mar filtrada estéril (AMFE). As barras representam média + desvio padrão (N=3 pools de 10-12 animais). * p<0,05 e ** p<0,01 representam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle para os hemócitos hialinos (HH), com exceção do gráfico (D), uma vez que não é possível distinguir os HG dos HH após a fagocitose. # representa diferenças estatísticas com p<0,05 em relação ao grupo controle, para os hemócitos granulares (HG).

4.1.2 Expressão gênica

Hemócitos de ostras incubados com a microalga nociva *A. minutum* apresentaram um aumento de expressão apenas do gene associado ao sistema imune IL-17 (cerca de 4,5x) em relação ao grupo controle (Fig. 6). Os outros genes analisados, implicados na imunologia (BPI, Defh2, Prx6, EcSOD), defesa antioxidante (GPx, SOD), estresse e detoxificação (Hsp70, GSTO, CYP356A1, FABP), não sofreram modulação após exposição à microalga (Fig. 6).

Por outro lado, quando estas células foram expostas à neurotoxina purificada STX houve alteração da expressão de quatro dos onze genes analisados, sendo dois relacionados ao sistema imune (IL-17 e Defh2), um a respostas de estresse (Hsp70) e o outro à detoxificação (CYP356A1). Curiosamente, os hemócitos expostos à STX apresentaram uma expressão da IL-17 cerca de 7x menor em relação ao grupo controle, contrariamente ao observado nos hemócitos incubados com a microalga *A. minutum* (Fig. 6). Uma menor expressão (3,5x) foi observada também no gene que codifica o CYP356A1 em hemócitos incubados com a STX (Fig. 6). Já os transcritos da Defh2 (Fig. 6) e Hsp70 (Fig. 6) apresentaram, respectivamente, uma expressão cerca de 7 e 2x maior após incubação com a STX. O restante dos genes, que codificam a BPI, Prx6, EcSOD, SOD, GPx, GSTO e FABP não apresentaram diferenças significativas nos níveis de transcritos nos hemócitos incubados com a toxina purificada (Fig. 6).

4.2 Estudo 2 - Efeito *in vitro* da microalga *Heterosigma akashiwo* e da toxina purificada brevetoxina (PbTx-2) em hemócitos de ostras *C. gigas*

4.2.1 Viabilidade dos hemócitos expostos aos produtos extracelulares (PECs) de *H. akashiwo*

A viabilidade dos hemócitos de *C. gigas* incubadas com os PECs provenientes das duas culturas de *H. akashiwo* em diferentes estágios de crescimento (PEC1 e PEC2) não se alterou significativamente tanto no ensaio do MTT como do VN (Fig. 7). Estes resultados de certa forma

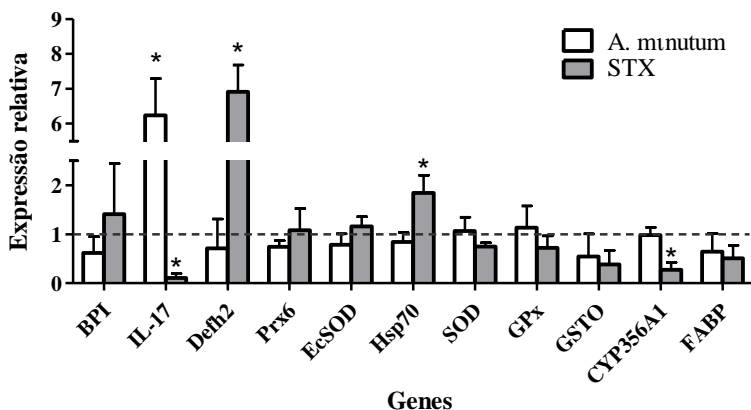


Figura 6. Expressão relativa dos 11 genes analisados em hemócitos de ostras *C. gigas* expostos à microalgas *A. minutum* (1:17, alga/hemócito) e saxitoxina (STX – 0,025 µg/L) durante 4 h. Linha pontilhada representa o grupo controle - hemócitos incubados apenas em água do mar filtrada estéril (AMFE). As barras representam médias + desvio padrão (N=3 pools de 10-12 animais). * representa diferenças significativas (p<0,05) para cada gene em relação ao seu grupo controle.

inesperados, nos fez questionar se a cepa em uso de *H. akashiwo* teria perdido a capacidade de produzir toxinas semelhantes à PbTx. Optamos então por realizar diferentes testes, baseados na literatura, para melhor avaliar a toxicidade da cepa da microalga utilizada. Para tal, foram realizados ensaios de ictiotoxicidade (peixe-rei *Coris julis* e alevinos de robalo *Centropomus parallelus*), de hemólise (eritrócitos de rato), de viabilidade de ovócitos de ostras (*C. gigas*) e de desenvolvimento de larvas de mexilhões (*Perna perna*). Surpreendentemente, as culturas da cepa de *H. akashiwo* utilizada neste estudo não apresentaram nenhum nível de toxicidade em todos estes testes realizados (dados não mostrados). A confirmação final destes resultados foi obtida através de análises de cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria de massas (LC-MS/MS) que revelou, de fato, a ausência de toxinas conhecidas nos extratos de nossas culturas de *H. akashiwo* (dados não mostrados), embora esta cepa tenha sido isolada de um evento que causou grande mortalidade de peixes em Nova Jersey, EUA, no ano de

1973. Frente a estes resultados, não foi possível comparar o efeito *in vitro* da microalga *H. akashiwo* com o efeito da toxina PbTx-2 purificada.

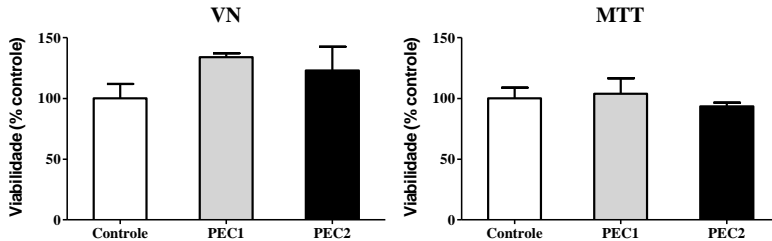


Figura 7. Viabilidade dos hemócitos de *C. gigas*, avaliada pelos ensaios do VN e MTT após incubação com os produtos extracelulares (PECs) de duas culturas de *H. akashiwo* em estágios diferente de crescimento (PEC1 – crescimento exponencial; PEC2 – fase estacionária). Controle – hemócitos incubados com meio de cultura estéril. As barras indicam as médias + desvio padrão (N=3 pools de 6 animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

4.2.2 Viabilidade dos hemócitos incubados com diferentes concentrações de PbTx-2

Os ensaios de viabilidade celular pelos métodos do MTT e VN não revelaram nenhuma alteração significativa nos hemócitos da ostra *C. gigas*, após incubação com as diferentes concentrações (3 a 1.000 µg/L) de PbTx-2, nos diferentes tempos (Fig. 8).

4.2.3 Porcentagem de hemócitos apoptóticos incubados com PbTx-2

Não foram observadas diferenças também nas alterações morfológicas nucleares indicativas de apoptose ou na presença de micronúcleos nos hemócitos expostos a PbTx-2 nas concentrações de 300 e 1.000 µg/L em relação ao grupo controle (Fig. 9). A porcentagem de núcleos apoptóticos e de micronúcleos foi inferior a 5% e 2% respectivamente, mesmo na mais alta concentração da toxina.

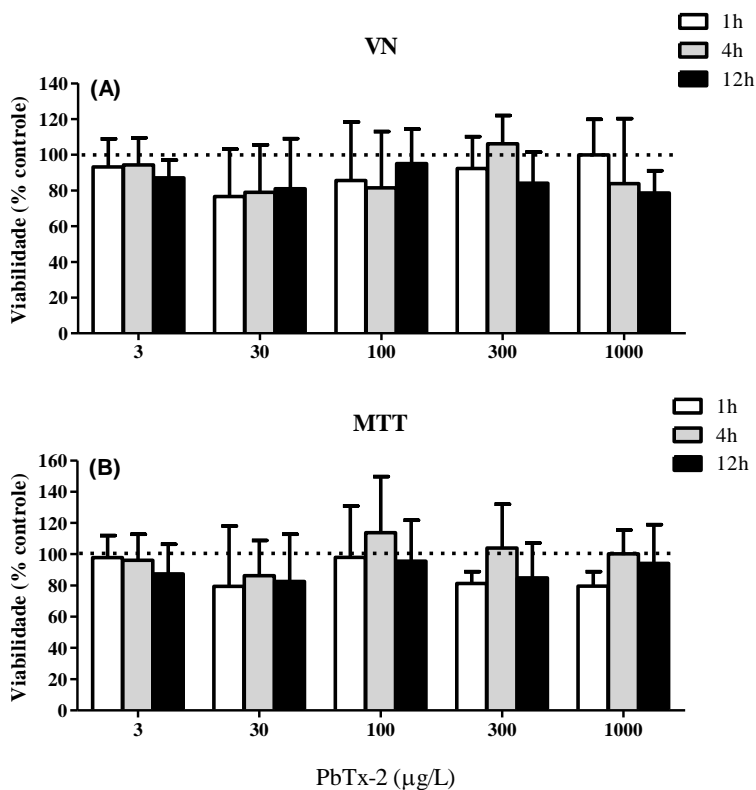


Figura 8. Viabilidade dos hemócitos de *C. gigas* avaliada através do ensaio do VN (A) e MTT (B) após incubação com diferentes concentrações de PbTx-2. Controle - hemócitos incubados em água do mar filtrada estéril (AMFE). As barras indicam as médias + desvio padrão (N=3-4 *pools* de 6-30 animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

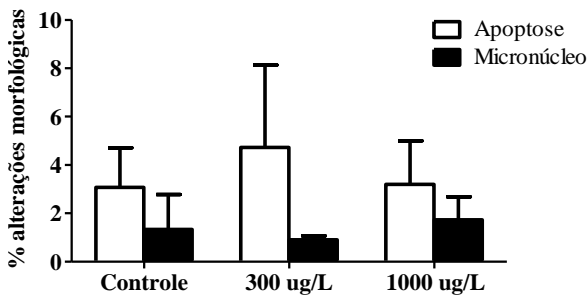


Figura 9. Porcentagem de hemócitos de *C. gigas* apresentando sinais de apoptose e/ou micronúcleo após 12 h de exposição a 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2. Controle - hemócitos incubados em água do mar filtrada estéril (AMFE). Barras indicam médias + desvio padrão (N=3 pools de 6-7 animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

4.2.2 Expressão gênica

A incubação dos hemócitos da ostra com 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2 levou a um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão dos genes que codificam a Hsp70 e o CYP356A1 (cerca de 2x) e um aumento marginalmente significativo ($p = 0,056$) de 2,7x do gene que codifica a FABP, apenas no caso da maior concentração da toxina (Fig. 10). Por outro lado, os genes que codificam as moléculas BPI, IL-17, EcSOD, Prx6, GPx, SOD e GSTO não sofreram alterações em suas expressões em nenhuma das concentrações de PbTx-2 analisadas (Fig. 10).

Curiosamente, não foi possível amplificar a sequência da Defh2 em hemócitos das ostras *C. gigas* cultivadas em SC, apesar da mesma ter sido amplificada em amostras de cDNA de hemócitos de ostras provenientes da França, sob as mesmas condições de tratamento das amostras e de qPCR.

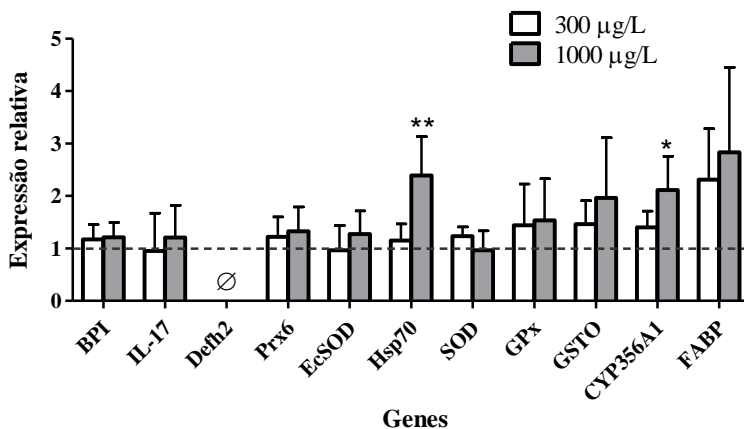


Figura 10. Expressão relativa dos 11 genes analisados em hemócitos de ostras *C. gigas* expostos a 300 e 1.000 µg/L de PbTx-2 durante 4 h. Linha pontilhada representa o grupo controle - hemócitos incubados em água do mar filtrada estéril (AMFE). O símbolo “vazio” (∅) indica que não foi possível amplificar os transcritos do gene indicado. As barras representam médias + desvio padrão (N=5 pools de 5-9 animais).* (p<0,05) e ** (p<0,01) representam diferenças significativas para cada gene em relação ao seu grupo controle.

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudo 1 - Efeito *in vitro* do dinoflagelado *Alexandrium minutum* e da saxitoxina (STX) em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas*

As florações de dinoflagelados do gênero *Alexandrium*, produtores de STXs, vêm ocasionando graves problemas em nível mundial, ameaçando tanto os ecossistemas marinhos, quanto os seres humanos consumidores de pescados contaminados. A STX é uma potente neurotoxina capaz de causar a síndrome paralisante em humanos. No entanto, o efeito desta toxina nos bivalves, filtradores e acumuladores desta toxina é ainda pouco estudado e pouco conhecido, principalmente no que se refere ao seu sistema imunológico. No presente estudo, foi avaliado o efeito *in vitro* de células vivas de *A. minutum* e da toxina STX purificada sobre os hemócitos de ostras *C. gigas*. Foram avaliados alguns parâmetros celulares (tamanho e complexidade, índice fagocítico, produção de ERO e viabilidade) e a expressão relativa de onze genes associados a mecanismos de defesa.

Nossos resultados mostraram que a viabilidade dos hemócitos da ostra não foi afetada pela exposição destas células à microalga nociva *A. minutum* ou à toxina por ela produzida (STX). Por outro lado, em ensaios similares, utilizando uma concentração 2,5x superior desta microalga foi observada uma diminuição da viabilidade dos hemócitos de *C. gigas* e também de *C. virginica* (HÉGARET *et al.*, 2011). Em contraste, os hemócitos de *C. gigas*, expostos *in vivo* a um fluxo contínuo de *A. minutum* (5×10^3 células/mL) durante 4 dias (equivalente a 6,5 ng de STX), não tiveram sua viabilidade diminuída (HABERKORN *et al.*, 2009).

A ausência de perda de viabilidade pelos hemócitos da ostra *C. gigas* após incubação com a microalga nociva ou a STX pode decorrer do fato dessas toxinas agirem principalmente em canais de sódio voltagem-dependentes típicos de células nervosas e ainda não descritos em hemócitos. Desta forma, espera-se que os efeitos em hemócitos sejam desvinculados de seus efeitos tóxicos já caracterizados em peixes e mamíferos (PEARSON *et al.*, 2010). De fato, alguns estudos mostram que bivalves expostos a elevadas concentrações de microalgas produtoras de STX, suficientes para causarem paralisia muscular nestes animais, não apresentaram alterações nas funções dos hemócitos (HÉGARET, WIKFORS *et al.*, 2007; FORD *et al.*, 2008).

Contudo, apesar da viabilidade dos hemócitos permanecer inalterada, foram observados efeitos deletérios em funções imunológicas chave desenvolvidas pelos hemócitos como a atividade fagocítica e produção de ERO. Ambas as atividades diminuíram consideravelmente, após incubação dos hemócitos das ostras tanto com a microalga *A. minutum*, como com a STX. A diminuição da produção de ERO foi também observada por HÉGARET *et al.* (2011) em hemócitos de *C. gigas* quando eram expostos à *A. minutum in vitro*. HABERKORN *et al.* (2009) realizaram um estudo com *A. minutum* que levava em consideração também o desenvolvimento gonadal de ostras *C. gigas*. Os autores observaram uma menor produção de ERO em hemócitos de ostras expostas à *A. minutum* quando estas apresentavam suas gônadas bem desenvolvidas. No entanto, quando as ostras se encontravam em estágio inicial de maturação gonadal havia, em contraste, uma indução da produção de ERO pelos hemócitos. Estes dados sugerem que o efeito da microalga nociva pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento reprodutivo das ostras. No que diz respeito à fagocitose, apesar de HÉGARET *et al.* (2011) terem encontrado o mesmo resultado com relação às ERO, o índice fagocítico dos hemócitos de *C. gigas* permaneceu inalterado em exposição à *A. minutum*. Por outro lado, neste mesmo estudo, outra espécie produtora de STX, *A. fundyense*, foi capaz de diminuir o índice fagocítico de hemócitos de duas outras espécies de bivalves *in vitro*. Além disso, existem relatos sobre a diminuição da fagocitose em hemócitos de bivalves expostos *in vivo* e *in vitro* também com outras espécies de microalgas nocivas (HÉGARET *et al.*, 2009; HÉGARET *et al.*, 2010; HÉGARET *et al.*, 2011).

As diminuições na taxa de fagocitose e na produção de ERO nos hemócitos das ostras, neste estudo, foram semelhantes após incubação com a microalga *A. minutum* e à toxina purificada STX. Estes resultados sugerem, portanto, que estes efeitos sofridos pelos hemócitos decorram especificamente da ficotoxina e não por outros compostos produzidos por esta microalga. Cabe ressaltar que a concentração de STX utilizada foi cerca de 20 vezes menor que concentrações já encontradas na água do mar durante florações de dinoflagelados produtores desta ficotoxina e de 10 a 200 vezes menor que a concentração de STX encontrada na carne de moluscos bivalves por grama de tecido (LEFEBVRE *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009). Portanto, concentrações maiores de STX, encontradas no ambiente,

poderiam causar efeitos ainda mais significativos no sistema imune das ostras.

A fagocitose e a produção de ERO são mecanismos essenciais para a eliminação de microorganismos invasores tanto em vertebrados quanto em invertebrados, como os bivalves (CANESI *et al.*, 2002). A supressão destes mecanismos de defesa em hemócitos de bivalves e particularmente na ostra *C. gigas* e outros bivalves, pode torná-los mais suscetíveis a infecções e, conseqüentemente, afetar sua sobrevivência tanto nos cultivos, quanto em populações naturais.

No presente estudo foi ainda observado um aumento do tamanho dos hemócitos granulares, após exposição à microalga nociva. Porém, esta alteração não se verificou no caso da toxina purificada. O aumento de tamanho dos hemócitos de bivalves já foi observado em estudos com microalgas nocivas (HEGARET & WIKFORS, 2005; HÉGARET *et al.*, 2010), contudo a razão deste aumento permanece obscura. Uma hipótese seria uma alteração da homeostase iônica, possivelmente devido ao comprometimento de transportadores ou canais iônicos da superfície dos hemócitos, levando a uma maior permeabilidade a água. No entanto, contrariamente, a maioria dos estudos relatam uma diminuição do tamanho e da complexidade dos hemócitos de bivalves expostos *in vitro* ou *in vivo* a diferentes espécies associadas a FANs (DA SILVA, HÉGARET *et al.*, 2008; GALIMANY, SUNILA *et al.*, 2008a; HABERKORN *et al.*, 2009; HEGARET *et al.*, 2009; HÉGARET *et al.*, 2011). Estes efeitos foram associados à degranulação das células ou à produção de novas células que não tiveram tempo suficiente para crescer e produzir grânulos.

Este é o primeiro estudo, de que temos conhecimento, a investigar o efeito de microalgas nocivas e/ou ficotoxinas em nível de expressão gênica em bivalves. Hemócitos de ostras *C. gigas* expostos à microalga *A. minutum* e à STX revelaram que quatro dos onze genes estudados foram significativamente modulados, sendo dois associados ao sistema imune (IL-17 e Defh2) e os outros dois a respostas de estresse (Hsp70) e à detoxificação (CYP356A1).

A IL-17 de *C. gigas*, homóloga à IL-17D de vertebrados, é a única citocina identificada em bivalves até o presente momento (ROBERTS *et al.*, 2008). Interessantemente, alguns estudos têm demonstrado que os hemócitos de bivalves podem ser estimulados por citocinas de vertebrados, desencadeando diversas respostas celulares como o aumento de sua motilidade e atividade fagocítica e a indução da enzima óxido nítrico sintase, responsável pela produção de espécies

reativas de nitrogênio (OTTAVIANI & FRANCHINI, 1995; OTTAVIANI *et al.*, 1995; OTTAVIANI *et al.*, 2000; NOVAS *et al.*, 2004). ROBERTS *et al.* (2008) observaram que a expressão gênica da IL-17 em hemócitos de *C. gigas* era fortemente induzida após desafio com bactérias Gram (+) e (-). No presente estudo, a indução da IL-17 poderia decorrer do reconhecimento de padrões moleculares presentes na superfície da microalga *A. minutum* como não-próprio, o que promoveria assim uma rápida indução de moléculas imunoregulatórias. Outros estudos já reportaram o reconhecimento e ativação dos hemócitos de bivalves em contato com microalgas nocivas, havendo uma indução de respostas hemocitárias contra estes organismos como a degranulação, agregação e fagocitose (GALIMANY *et al.*, 2008a,b,c; HEGARET *et al.*, 2011). A falta de indução na expressão gênica das outras proteínas associadas ao sistema imune (BPI, Prx6, Defh2 e EcSOD) em hemócitos incubados com a microalga, sugere que essas moléculas imunofetoras não são induzidas a curto prazo (4 h) ou que elas podem ser reguladas por vias independentes.

Contrariamente, a incubação dos hemócitos da ostra com a STX levou a uma redução da expressão de IL-17, mostrando assim uma diferença de padrão de resposta quando se usa a microalga íntegra (indução de uma resposta imune) ou a ficotoxina purificada.

A modulação dos outros três genes que apresentaram diferenças significativas nos hemócitos de *C. gigas*, ocorreu apenas após exposição com a ficotoxina purificada STX e não com as microalgas íntegras. A STX foi capaz de estimular a expressão do peptídeo antimicrobiano Defh2. O único estudo encontrado que avaliou a expressão da defensina em ostras *C. gigas* em resposta a um xenobionte (pesticida), revelou uma diminuição nos seus níveis de transcritos (GAGNAIRE *et al.*, 2007). Por outro lado, em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* a expressão da defensina aumentou consideravelmente após exposição *in vitro* dos hemócitos a concentrações de cromo consideradas não-tóxicas (CIACCI *et al.*, 2011). Contudo, a maioria dos estudos reporta a modulação da expressão gênica de defensinas em bivalves após desafio com bactérias ou fungos (GUEGUEN *et al.*, 2006; GONZALEZ, GUEGUEN, DESSERRE *et al.*, 2007), choque térmico (LI *et al.*, 2010) ou sazonalidade (LI *et al.*, 2009). Desta forma, o mecanismo pelo qual levou ao aumento na expressão da Defh2 associada à STX permanece obscuro, abrindo novas perspectivas sobre o efeito imunestimulador de xenobiontes na expressão de moléculas antimicrobianas em bivalves.

No presente estudo, foi observado também um aumento na expressão gênica da proteína de choque térmico Hsp70 mediante incubação dos hemócitos com a STX. Alguns estudos têm relatado a indução da Hsp70 em bivalves expostos a compostos tóxicos como metais (PIANO, VALBONESI & FABBRI, 2004; LA PORTE, 2005; MIĆOVIĆ *et al.*, 2009; CIACCI *et al.*, 2011), misturas de hidrocarbonetos (BOUTET, TANGUY & MORAGA, 2004) e a locais contaminados com efluentes domésticos e industriais (HAMER *et al.*, 2004). Além disso, em bivalves também já foram registrados aumentos na expressão da Hsp70 durante infecções (TIRARD *et al.*, 1995; ENCOMIO & CHU, 2005; CELLURA *et al.*, 2007). Estes estudos, em conjunto, reforçam o papel da Hsp70 nas respostas de estresse em geral, sendo frequentemente associada como um marcador de estresse inespecífico em bivalves (FEDER & HOFMANN, 1999; FABBRI, VALBONESI & FRANZELLITTI, 2008). Além disso, a indução da Hsp70 já esteve associada a um aumento da resistência em bivalves, assim como outros organismos, a alguns tipos de estressores, incluindo compostos tóxicos (FEDER & HOFMANN, 1999; TEDENGREN *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2006).

A incubação dos hemócitos de *C. gigas* com STX causou ainda uma redução da expressão da isoforma de citocromo P450, CYP356A1. Segundo TOLEDO-SILVA *et al.* (2008), esta isoforma apresenta maior similaridade com citocromos da família CYP17, associada ao metabolismo de esteróides, e uma menor similaridade com a família CYP1, associada ao metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Em células de vertebrados, já foi descrita a redução *in vitro* da expressão gênica do CYP3A4, associada à xenobiontes, sendo esta, possivelmente mediada pelo receptor nuclear SXR (do inglês *steroid and xenobiotic receptor*), que regula a expressão do CYP3A4 (TAKESHITA *et al.*, 2002). Em *C. gigas*, porém, ainda não foi identificado nenhum receptor nuclear em hemócitos. Já é bem estabelecido que enzimas da família dos citocromos P450 são essenciais para a biotransformação de xenobiontes. Sabendo que os bivalves muitas vezes se encontram em ambientes sujeitos a diversos níveis de contaminação por diferentes tipos de xenobiontes, a associação de uma floração de microalga produtora de STX com a presença de contaminantes poderia potencializar os efeitos deletérios que cada agente estressor teria separadamente, nos bivalves, diminuindo assim suas chances de sobrevivência.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os hemócitos ressentem a presença tanto da microalga nociva *A. minutum*, quanto de sua toxina *in vitro*, nas concentrações (2.10^4 células/mL da microalga e 0,0375 µg/L da toxina purificada) e tempo testados (4 h). Estudos *in vitro* possuem muitas vantagens, entre elas, a necessidade de uma menor quantidade de animais, microalgas e toxina e menores tempos de exposição, tornando assim o método muito mais rápido e viável. Além disso, os hemócitos podem entrar em contato direto com microalgas nocivas e suas toxinas mesmo *in vivo*. Alguns estudos com bivalves já demonstraram que os hemócitos sofrem diapedese, atravessando o epitélio do intestino para interagir diretamente com diferentes espécies de microalgas nocivas (GALIMANY, PLACE *et al.*, 2008; GALIMANY, SUNILA *et al.*, 2008b; a; HÉGARET *et al.*, 2010). Por outro lado, as microalgas digeridas no intestino dos bivalves liberam suas toxinas que se acumulam e se distribuem por vários tecidos dos animais, podendo, inclusive, entrar em circulação na hemolinfa (FORD *et al.*, 2008). Contudo, ainda assim torna-se necessário, num segundo momento, confirmar os resultados obtidos no presente estudo em modelos *in vivo* tanto em experimentos controlados em laboratório, quanto no ambiente, a fim de validar os reais efeitos das florações de microalgas e suas toxinas em bivalves cultivados ou de estoques naturais.

5.2 Estudo 2 - Efeito *in vitro* da microalga *Heterosigma akashiwo* e da toxina purificada PbTx-2 em hemócitos de ostras *C. gigas*

Como discutido anteriormente, algumas espécies de algas nocivas como o dinoflagelado *Karenia brevis*, mas também da rafdofíceia *Heterosigma akashiwo*, podem produzir uma potente neurotoxina, denominada brevetoxina (PbTx). Estas toxinas são letais para peixes e podem causar intoxicação neurotóxica (NSP) em humanos, a partir do consumo de bivalves contaminados. Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo a avaliar o efeito de uma PbTx em células do sistema imune de bivalves. Neste estudo, foi avaliado o efeito *in vitro* da PbTx-2 em hemócitos de ostras *C. gigas*, sendo analisados alguns parâmetros celulares como a viabilidade e índice apoptótico destas células, assim como a expressão relativa de onze genes associados a mecanismos de defesa em hemócitos.

Infelizmente, como mencionado anteriormente, não foi possível comparar os efeitos da toxina PbTx-2 purificada com o de microalgas

íntegras produtoras desta toxina (*H. akashiwo*), uma vez que a cepa utilizada desta microlaga perdeu a capacidade de produzir toxinas por motivos pouco compreendidos. Desta forma, nosso estudo incluiu apenas a ação da brevetoxina purificada PbTx-2. Foram utilizadas várias concentrações desta toxina sendo que a concentração mais baixa utilizada (3 µg/L) já foi registrada na água do mar durante uma floração branda de *K. brevis* (baixa densidade de algas) e a concentração de 30 µg/L, foi notificada durante uma floração forte (elevada densidade de algas) (PLAKAS *et al.*, 2008; HEIL & STEIDINGER, 2009; ERRERA *et al.*, 2010). As demais concentrações, apesar de não serem comumente encontradas na água do mar durante as florações, podem ser facilmente acumuladas nos tecidos moles das ostras, por estas serem animais sésseis e filtradores.

A ausência de efeito da PbX-2 sobre a viabilidade dos hemócitos de *C. gigas* após diferentes tempos de exposição, inclusive na maior concentração (1.000 µg/L), foi inesperada. Além disso, a porcentagem de hemócitos apoptóticos não se alterou, o que reforça a idéia de uma ausência de efeitos citotóxicos desta toxina nos hemócitos. Por outro lado, estes resultados podem não ser tão surpreendentes, já que o mecanismo de toxicidade desta molécula se dá através do bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes de células excitáveis como neurônios e junções neuro-musculares (WANG, 2008). HÉGARET *et al.* (2011) observaram uma diminuição da viabilidade de hemócitos de ostras *C. virginica* e de amêijoas *Mercenaria mercenaria* expostos *in vitro* à microalga *H. akashiwo*, supostamente produtora de PbTx-2. Levando em consideração os resultados obtidos no presente trabalho, essa diminuição na viabilidade poderia ser decorrente de outros compostos produzidos pela microalga *H. akashiwo* e não à PbTx-2, uma vez que esta espécie já foi descrita como produtora de ERO (TWINER & TRICK, 2000), compostos hemolíticos (LING & TRICK, 2010) e compostos orgânicos extracelulares potencialmente tóxicos (TWINER, DIXON & TRICK, 2004; TWINER *et al.*, 2005).

A falta de efeito da PbTx-2 nos parâmetros celulares testados, poderia ser explicada também pela indução de genes relacionados a mecanismos de proteção, uma vez que, neste estudo, os resultados das análises de expressão gênica mostraram um aumento nos níveis de transcritos da Hsp70 e do CYP356A1.

Interessantemente, a expressão da Hsp70 foi induzida tanto em hemócitos incubados com a PbTx-2 quanto com a STX, purificadas. Estes resultados reforçam a idéia de que esta proteína pode funcionar

como marcadora de respostas de estresse em geral, como discutido no item anterior. A Hsp70 pode estar associada, ainda, a um possível mecanismo de proteção contra os efeitos tóxicos destas toxinas, já que em ambos os estudos a viabilidade dos hemócitos se manteve inalterada, inclusive por até 12 h de incubação com a PbTx-2.

A incubação dos hemócitos com a maior concentração de PbTx-2 (1.000 µg/L) aumentou os níveis de transcritos do CYP356A1, em contraste ao observado com a STX, sugerindo uma atuação potencial desta isoforma de CYP no metabolismo de PbTxs. Bivalves são capazes de acumular e metabolizar estas toxinas, produzindo metabólitos oxidados, reduzidos, hidrolisados ou ainda conjugados à cisteína (PLAKAS *et al.*, 2008; PLAKAS & DICKEY, 2010). Contudo, detalhes destas vias de metabolização de PbTxs ainda não foram descritos em bivalves. Por outro lado, a metabolização da PbTx-2 já foi associada à atividade de CYPs de humanos, ratos e peixes (WASHBURN *et al.*, 1994; RADWAN & RAMSDELL, 2006; GUO, AN & REIN, 2010). Dentre os metabólitos produzidos por CYPs descritos nestes estudos, alguns correspondem a compostos já identificados nos tecidos de ostras, como por exemplo, a PbTx-3 e a PbTx-9 (PLAKAS *et al.*, 2002; PLAKAS *et al.*, 2004). Portanto, o aumento no nível de transcritos de uma isoforma de CYP encontrado no presente estudo, abre a possibilidade de se estudar se esta enzima atua de fato na biotransformação da PbTx-2.

Estudos realizados com ratos e peixes sugerem que as GSTs poderiam estar associadas à metabolização da PbTx-2 (WASHBURN *et al.*, 1994; RADWAN & RAMSDELL, 2006). Além disso, conjugados de PbTxs com a GSH e seus dipeptídeos correspondentes já foram detectados nos tecidos de ostras (PLAKAS *et al.*, 2004). No presente estudo, o nível de transcritos da GSTO não apresentou diferenças significativas, apesar de ter havido uma tendência de aumento (cerca de 2x) nos hemócitos expostos à maior concentração de PbTx-2. Cabe, no entanto salientar que apenas a expressão de uma isoforma de GST foi avaliada neste estudo, sendo que outras isoformas não aqui avaliadas pudessem estar envolvidas no metabolismo da PbTx-2 e ter sua expressão modulada. Por outro lado, de acordo com LIVINGSTONE *et al.* (1998), em invertebrados aquáticos, as enzimas de fase II, tais como as GSTs, são geralmente menos sensíveis à exposição a xenobiontes orgânicos que os CYPs.

No presente estudo, o nível de transcritos da FABP mostrou uma clara tendência de aumento (cerca de 2,5x) em hemócitos expostos

a ambas as concentrações de PbTx-2, embora estas diferenças não tenham sido significativas. Como mencionado anteriormente, apesar da função desta proteína não estar ainda totalmente elucidada, já existem relatos sobre seu envolvimento no metabolismo de xenobiontes (VELKOV *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2008). Os resultados obtidos sugerem, portanto que a FABP poderia de fato estar envolvida no metabolismo da PbTx-2 em hemócitos, embora análises confirmatórias, com um maior tempo de incubação ou com um maior número de réplicas experimentais sejam ainda necessárias.

Assim como discutido no item anterior, análises futuras envolvendo a exposição *in vivo* das ostras à PbTx-2 se fazem necessárias para validar e ampliar os resultados encontrados. Além do mais, o presente estudo abre novas perspectivas para uma maior compreensão de processos de biotransformação e detoxificação em hemócitos, campo este ainda inexplorado.

6. CONCLUSÕES

Os estudos *in vitro* realizados com hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* mostraram que tanto a microalga nociva *Alexandrium minutum*, quanto as ficotoxinas purificadas STX e PbTx-2, não causaram toxicidade celular, conforme evidenciado pelos ensaios de viabilidade e de apoptose. Apesar disso, algumas funções celulares importantes para o desencadeamento da resposta imune, como a fagocitose e a produção de ERO, foram de fato prejudicadas tanto pela microalga *A. minutum* quanto pela STX, sugerindo que estes animais possam se tornar mais suscetíveis a infecções durante FANs produtoras de STX.

Outra resposta em comum das duas toxinas foi a indução da Hsp70 nestas células, reforçando a idéia de que esta proteína pode funcionar como marcadora de respostas de estresse em geral. Este resultado abre também perspectivas para se estudar um potencial efeito protetor desta proteína em resposta a xenobiontes. Além disso, ambas as toxinas não alteraram os níveis de transcritos das proteínas associadas ao sistema antioxidante (SOD e GPX), assim como de algumas proteínas associadas ao sistema imune (Prx6, EcSOD e BPI).

Foi possível observar ainda que apesar da microalga *A. minutum* e a STX terem provocado efeitos semelhantes no que diz respeito aos parâmetros celulares analisados, curiosamente, foram observados efeitos opostos em relação à expressão gênica, uma vez que a toxina purificada foi a que causou maior efeito nos hemócitos da ostra, em relação à microalga íntegra. A repressão dos genes que codificam o CYP356A1 e a IL-17 induzida pela STX poderia levar a uma maior susceptibilidade das ostras a estressores ambientais como contaminantes orgânicos e patógenos, respectivamente. Em estudos futuros, seria interessante confirmar se estas respostas também acontecem *in vivo* e se a STX poderia de fato diminuir a resistência das ostras durante um desafio com patógenos ou xenobiontes.

Ao contrário do observado com a STX, a indução da expressão gênica do CYP356A1 e tendências de aumento da expressão da FABP e GSTO após exposição à PbTx-2 abrem novas oportunidades de estudos relacionados a mecanismos de detoxificação em hemócitos de bivalves. Além disso, a PbTx-2 não promoveu uma modulação na expressão de nenhum dos genes associados ao sistema imune e antioxidante, sugerindo que esta toxina não atue de maneira marcante sobre estes sistemas.

Em conclusão, este estudo revela que a STX, de modo geral, causou aparentemente uma resposta de imunossupressão nos hemócitos de ostras, enquanto que a PbTx-2 estimulou mecanismos de defesa relacionados ao estresse e detoxificação. Revela ainda que as ficotoxinas apresentam efeitos específicos e interferem com a expressão gênica de hemócitos sendo, portanto, potencialmente tóxicas para bivalves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACKER, L. C.; MCGILLICUDDY, D. J. J. Harmful algal blooms: at the interface between coastal oceanography and human health. *Oceanography*, v. 19, n. 2, p. 94-106, 2006.
- BARRACCO, M. A.; DA SILVA, P. M. Hemolinfa e Sistema Imune. In: RESGALLA JUNIOR, C. *et al* (Ed.). *O Mexilhão Perna perna (L.)*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 324.
- BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene*, v. 329, p. 147-157, 2004.
- BOUTET, I.; TANGUY, A.; ROUSSEAU, S.; AUFFRET, M.; MORAGA, D. 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 & Chaperones*, v. 8, n. 1, p. 76-85, Spr 2003.
- BRAND, L. E.; CAMPBELL, L.; BRESNAN, E. KARENIA: The biology and ecology of a toxic genus. *Harmful Algae*, v. in press., 2011.
- CANESI, L.; GALLO, G.; GAVIOLI, M.; PRUZZO, C. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, v. 57, n. 6, p. 469-476, 2002.
- CARVALHO PINTO-SILVA, C. R.; CREPPY, E. E.; MATIAS, W. G. Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Archives of Toxicology*, v. 79, p. 422-426, 2005.
- CARVALHO PINTO-SILVA, C. R.; FERREIRA, J. F.; COSTA, R. H. R.; BELLI FILHO, P.; CREPPY, E. E.; MATIAS, W. G. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicol*, v. 41, n. 1, p. 93-97, 2003.
- CELLURA, C.; TOUBIANA, M.; PARRINELLO, N.; ROCH, P. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 22, n. 4, p. 340-350, 2007.
- CIACCI, C.; BARMO, C.; FABBRI, R.; CANONICO, B.; GALLO, G.; CANESI, L. Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic

doses of hexavalent Chromium. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 31, n. 6, p. 1026-1033, 2011.

COSTA, P. R.; BAUGH, K. A.; WRIGHT, B.; RALONDE, R.; NANCE, S. L.; TATARENKOVA, N.; ETHERIDGE, S. M.; LEFEBVRE, K. A. Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska. *Toxicon*, v. 54, n. 3, p. 313-320, 2009.

DA SILVA, P. M.; HEGARET, H.; LAMBERT, C.; WIKFORS, G. H.; LE GOIC, N.; SHUMWAY, S. E.; SOUDANT, P. 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, Mar 15 2008.

DA SILVA, P. M.; HÉGARET, H.; LAMBERT, C.; WIKFORS, G. H.; LE GOIC, N.; SHUMWAY, S. E.; SOUDANT, P. 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, Mar 15 2008.

DAVID, E.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Peroxiredoxin 6 gene: A new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, v. 84, n. 3, p. 389-398, Oct 2007.

DIZER, H.; FISCHER, B.; HARABAWY, A. S. A.; HENNION, M. C.; HANSEN, P. D. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, v. 55, n. 3-4, p. 149-156, 2001.

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, n. 1, p. 167-175, Jan 2005.

EPAGRI/CEDAP. Síntese informativa da produção de moluscos. 2010.

ERRERA, R. M.; BOURDELAIS, A.; DRENNAN, M. A.; DODD, E. B.; HENRICHS, D. W.; CAMPBELL, L. Variation in brevetoxin and brevenal content among clonal cultures of *Karenia brevis* may influence bloom toxicity. *Toxicon*, v. 55, n. 2-3, p. 195-203, Feb-Mar 2010.

- ESTEVEES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 142, n. 3-4, p. 262-274, 2006.
- FABBRI, E.; VALBONESI, P.; FRANZELLITTI, S. HSP expression in bivalves. *Invertebrate Survival Journal*, v. 5, p. 135-161, 2008.
- FAO. Marine Biotoxins. Rome2004. p. 295.
- _____. *The state of food and aquaculture*. Rome, 2009.
- 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.
- FERREIRA, J. F.; NETO, F. M. D. O. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. v. 2011. n. 27/12. Florianópolis2006.
- FORD, S. E.; BRICELJ, V. M.; LAMBERT, C.; PAILLARD, C. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes. *Marine Biology*, v. 154, n. 2, p. 241-253, 2008.
- GAGNAIRE, B.; GAY, M.; HUVET, A.; DANIEL, J. Y.; SAULNIER, D.; RENAULT, T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*, v. 84, n. 1, p. 92-102, 2007.
- GALIMANY, E.; PLACE, A. R.; RAMON, M.; JUTSON, M.; PIPE, R. K. 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, 2008.
- GALIMANY, E.; SUNILA, I.; HÉGARET, H.; RAMON, M.; WIKFORS, G. H. 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, Aug 2008a.
- _____. 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, Aug 2008b.
- GARCÍA, C.; DEL CARMEN BRAVO, M. A.; LAGOS, M.; LAGOS, N. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid

samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon*, v. 43, n. 2, p. 149-158, 2004.

- GONZALEZ, M.; GUEGUEN, Y.; DESSERRE, G.; DE LORGERIL, J.; ROMESTAND, B.; BACHÈRE, E. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 31, n. 4, p. 332-339, 2007.
- GONZALEZ, M.; GUEGUEN, Y.; DESTOUMIEUX-GARZON, D.; ROMESTAND, B.; FIEVET, J.; PUGNIERE, M.; ROQUET, F.; ESCOUBAS, J. M.; VANDENBULCKE, F.; LEVY, O.; SAUNE, L.; BULET, P.; BACHERE, E. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 45, p. 17759-17764, Nov 6 2007.
- GONZALEZ, M.; ROMESTAND, B.; FIEVET, J.; HUVET, A.; LEBART, M.-C.; GUEGUEN, Y.; BACHÈRE, E. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, n. 2, p. 1089-1097, 2005.
- GUEGUEN, Y.; HERPIN, A.; AUMELAS, A.; GARNIER, J.; FIEVET, J.; ESCOUBAS, J. M.; BULET, P.; GONZALEZ, M.; LELONG, C.; FAVREL, P.; BACHERE, E. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* - Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 1, p. 313-323, Jan 6 2006.
- GUILLARD, R. R. L.; HARGRAVES, P. E. *Stichochrysis-Immobilis* Is a Diatom, Not a Chrysophyte. *Phycologia*, v. 32, n. 3, p. 234-236, May 1993.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. & Chanley, M. H. (eds.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum, New York, USA, 1975, p.29-60.
- GUO, F.; AN, T.; REIN, K. S. Human metabolites of brevetoxin PbTx-2: Identification and confirmation of structure. *Toxicon*, v. 56, n. 4, p. 648-651, Sep 15 2010.
- GUO, X.; WANG, Y.; WANG, L.; LEE, J. Oysters. In: KOCHER, T. D.; KOLE, C. (Ed.). *Genome Mapping and Genomics in Animals*. Berlin: Springer, 2008. Cap.8. p. 163-175.

- HABERKORN, H.; LAMBERT, C.; LE GOÏC, N.; GUÉGUEN, M.; MOAL, J.; PALACIOS, E.; LASSUS, P.; SOUDANT, P. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, v. In Press, 2009.
- HALLEGRAEFF, G. M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, v. 32, n. 2, p. 79-99, Mar 1993.
- _____. Harmful algal blooms: a global overview. In: HALLEGRAEFF, G. M. et al (Ed.). *Manual on Harmful Marine Algae*. Paris: United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization, 2003. p. 25-49.
- _____. 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.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radical in Biology and Medicine*. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- HAMER, B.; HAMER, D. P.; MÜLLER, W. E. G.; BATEL, R. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environment International*, v. 30, n. 7, p. 873-882, 2004.
- HEGARET, H.; DA SILVA, P. M.; SUNILA, I.; SHUMWAY, S. E.; DIXON, M. S.; ALIX, J.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 371, n. 2, p. 112-120, Apr 15 2009.
- HÉGARET, H.; DA SILVA, P. M.; SUNILA, I.; SHUMWAY, S. E.; DIXON, M. S.; ALIX, J.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 371, n. 2, p. 112-120, Apr 15 2009.
- HÉGARET, H.; DA SILVA, P. M.; WIKFORS, G. H.; HABERKORN, H.; SHUMWAY, S. E.; SOUDANT, P. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biology and Toxicology*, v. 27, n. 4, p. 249-266, Aug 2011.
- HÉGARET, H.; DA SILVA, P. M.; WIKFORS, G. H.; LAMBERT, C.; DE BETTIGNIES, T.; SHUMWAY, S. E.; SOUDANT, P. 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, Oct 30 2007.

HÉGARET, H.; SHUMWAY, S. E.; WIKFORS, G. H. Effects of harmful algae on physiology and hemocyte parameters of the Northern Bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Journal of Shellfish Research*, v. 26, n. 4, p. 1316-1316, Dec 2007.

HÉGARET, H.; SMOLOWITZ, R. M.; SUNILA, I.; SHUMWAY, S. E.; ALIX, J.; DIXON, M.; WIKFORS, G. H. Combined effects of a parasite, QPX, and the harmful-alga, *Prorocentrum minimum* on northern quahogs, *Mercenaria mercenaria*. *Marine Environmental Research*, v. 69, n. 5, p. 337-344, 2010.

HEGARET, H.; WIKFORS, G. H. 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*, v. 4, n. 2, p. 201-209, Feb 2005.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H. 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*, v. 4, n. 2, p. 201-209, Feb 2005a.

_____. 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*, v. 4, n. 2, p. 187-199, 2005b.

HÉGARET, 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, Sep 2003a.

_____. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 293, n. 2, p. 249-265, Sep 2003b.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P.; LAMBERT, C.; SHUMWAY, S. E.; BERARD, J. B.; LASSUS, P. Toxic dinoflagellates

(*Alexandrium fundyense* and *A-catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Marine Biology*, v. 152, n. 2, p. 441-447, 2007.

HEIL, C. A.; STEIDINGER, K. A. Monitoring, management, and mitigation of *Karenia* blooms in the eastern Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, v. 8, n. 4, p. 611-617, 2009.

KEPPLER, C. J.; LEWITUS, A. J.; RINGWOOD, A. H.; HOGUET, J.; STATON, T. Sublethal cellular effects of short-term raphidophyte and brevetoxin exposures on the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology-Progress Series*, v. 312, p. 141-147, 2006.

KHAN, S.; ARAKAWA, O.; ONOUE, Y. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquaculture Research*, v. 28, n. 1, p. 9-14, Jan 1997.

LA PORTE, P. *Mytilus trossulus* hsp70 as a biomarker for arsenic exposure in the marine environment: Laboratory and real-world results. *Biomarkers*, v. 10, n. 6, p. 417-428, 2005.

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

LEFEBVRE, K.; BILL, B.; ERICKSON, A.; BAUGH, K.; O'ROURKE, L.; COSTA, P.; NANCE, S.; TRAINER, V. Characterization of Intracellular and Extracellular Saxitoxin Levels in Both Field and Cultured *Alexandrium* spp. Samples from Sequim Bay, Washington. *Marine Drugs*, v. 6, n. 2, p. 103-116, 2008.

LEVERONE, J. R.; BLAKE, N. J.; PIERCE, R. H.; SHUMWAY, S. E. Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida. *Toxicon*, v. 48, n. 1, p. 75-84, Jul 2006.

LI, H.; TOUBIANA, M.; MONFORT, P.; ROCH, P. Influence of temperature, salinity and *E. coli* tissue content on immune gene expression in mussel: Results from a 2005–2008 survey. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 33, n. 9, p. 974-979, 2009.

LI, H.; VENIER, P.; PRADO-ALVÁREZ, M.; GESTAL, C.; TOUBIANA, M.; QUARTESAN, R.; BORGHESAN, F.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A.; ROCH, P. Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 28, n. 4, p. 640-648, 2010.

- LING, C.; TRICK, C. G. Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. *Harmful Algae*, v. 9, n. 5, p. 522-529, Jun 2010.
- LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.
- MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; TOLEDO-SILVA, G.; RODRIGUES, T. B.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 26, n. 3, p. 362-365, 2008.
- MEISTERTZHEIM, A. L.; TANGUY, A.; MORAGA, D.; THEBAULT, M. T. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *Febs Journal*, v. 274, n. 24, p. 6392-6402, 2007.
- 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.
- MENEZES, M.; BRANCO, S.; PROENCA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A. Bloom of *Alexandrium minutum* Halim on Rio de Janeiro coast: occurrence and toxicity. *Harmful Algae News*, 2007.
- MIĆOVIĆ, V.; BULOG, A.; KUČIĆ, N.; JAKOVAC, H.; RADOŠEVIĆ-STAIŠIĆ, B. Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 28, n. 3, p. 439-447, 2009.
- NOVAS, A.; CAO, A.; BARCIA, R.; RAMOS-MARTINEZ, J. I. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, n. 3, p. 390-394, 2004.
- O'HALLORAN, C.; SILVER, M. W.; HOLMAN, T. R.; SCHOLIN, C. A. *Heterosigma akashiwo* in central California waters. *Harmful Algae*, v. 5, n. 2, p. 124-132, 2006.

- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A. Immune and neuroendocrine responses in molluscs: The role of cytokines. *Acta Biologica Hungarica*, v. 46, n. 2-4, p. 341-349, 1995.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; CASSANELLI, S.; GENEDANI, S. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biology of the Cell*, v. 85, n. 1, p. 87-91, 1995.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; MALAGOLI, D.; GENEDANI, S. Immunomodulation by recombinant human interleukin-8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, n. 3, p. 506-513, Mar 2000.
- PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, v. 8, n. 5, p. 1650-1680, May 2010.
- PERSICH, G. R.; KULIS, D. M.; LILLY, E. L.; ANDERSON, D. M.; GARCIA, V. M. T. Probable origin and toxin profile of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech from southern Brazil. *Harmful Algae*, v. 5, n. 1, p. 36-44, 2006.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, May 2001.
- PIANO, A.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress & Chaperones*, v. 9, n. 2, p. 134-142, 2004.
- PICOT, C.; NGUYEN, T. A.; ROUDOT, A. C.; PARENT-MASSIN, D. A Preliminary Risk Assessment of Human Exposure to Phycotoxins in Shellfish: A Review. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 17, n. 2, p. 328-366, 2011.
- PLAKAS, S. M.; DICKEY, R. W. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon*, v. 56, n. 2, p. 137-149, Aug 2010.
- PLAKAS, S. M.; EL SAID, K. R.; JESTER, E. L. E.; GRANADE, H. R.; MUSSER, S. M.; DICKEY, R. W. Confirmation of brevetoxin metabolism in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by controlled exposures to pure

- toxins and to *Karenia brevis* cultures. *Toxicon*, v. 40, n. 6, p. 721-729, 2002.
- PLAKAS, S. M.; JESTER, E. L. E.; EL SAID, K. R.; GRANADE, H. R.; ABRAHAM, A.; DICKEY, R. W.; SCOTT, P. S.; FLEWELLING, L. J.; HENRY, M.; BLUM, P.; PIERCE, R. Monitoring of brevetoxins in the *Karenia brevis* bloom-exposed Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Toxicon*, v. 52, n. 1, p. 32-38, Jul 2008.
- PLAKAS, S. M.; WANG, Z. H.; EL SAID, K. R.; JESTER, E. L. E.; GRANADE, H. R.; FLEWELLING, L.; SCOTT, P.; DICKEY, R. W. Brevetoxin metabolism and elimination in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) after controlled exposures to *Karenia brevis*. *Toxicon*, v. 44, n. 6, p. 677-685, 2004.
- POLI, C. R.; LITTLEPAGE, J. Desenvolvimento do cultivo de moluscos no Estado de Santa Catarina. 1998. Disponível em: <http://www.lmm.ufsc.br/data/files/cultivo_em_sc.pdf>. Acesso em: 28/12/2011.
- PROENÇA, L. A. O. Algal blooms in coastal zones: Examples of harmful impacts from the Brazilian coast. *Journal of Coastal Research*, v. 1, p. 76-78, 2006.
- PROENÇA, L. A. O.; FONSECA, R. S.; PINTO, T. O. *Microalgas em área de cultivo do litoral de Santa Catarina*. São Paulo: Rima, 2011.
- RADWAN, F. F. Y.; RAMSDELL, J. S. Characterization of in vitro oxidative and conjugative metabolic pathways for brevetoxin (PbTx-2). *Toxicological Sciences*, v. 89, n. 1, p. 57-65, Jan 2006.
- ROBERTS, S.; GUEGUEN, Y.; DE LORGERIL, J.; GOETZ, F. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 32, n. 9, p. 1099-1104, 2008.
- ROBINSON, M. W.; HUTCHINSON, A. T.; DALTON, J. P.; DONNELLY, S. Peroxiredoxin: a central player in immune modulation. *Parasite Immunology*, v. 32, n. 5, p. 305-313, 2010.
- SHUMWAY, S. E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 21, p. 65-104, 1990.

- SNYDER, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, v. 48, n. 4, p. 529-547, Apr 2000.
- SONG, L.; WANG, L.; QIU, L.; ZHANG, H. Bivalve immunity. In: SODERHALL, K. (Ed.). *Invertebrate Immunity*. New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, 2010. Cap.3. p. 316. (Advances in experimental medicine and biology).
- SONG, L.; WU, L.; NI, D.; CHANG, Y.; XU, W.; XING, K. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 21, n. 4, p. 335-345, 2006.
- TAKESHITA, A.; TAGUCHI, M.; KOIBUCHI, N.; OZAWA, Y. Putative role of the orphan nuclear receptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics. *J Biol Chem*, v. 277, n. 36, p. 32453-8, Sep 6 2002.
- TEDENGREN, M.; OLSSON, B.; REIMER, O.; BROWN, D. C.; BRADLEY, B. P. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquatic Toxicology*, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2000.
- TIRARD, C. T.; GROSSFELD, R. M.; VOLETY, A. K.; CHU, F. L. E. Heat-Shock Proteins of the Oyster Parasite *Perkinsus-Marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 22, n. 2, p. 147-151, Jun 15 1995.
- TOLEDO-SILVA, G. D.; SIEBERT, M. N.; MEDEIROS, I. D.; SINCERO, T. C. M.; MORAES, M. O.; GOLDSTONE, J. V.; BAINY, A. C. D. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, v. 66, n. 1, p. 15-18, 2008.
- TREVISAN, R.; ARL, M.; SACCHET, C. L.; ENGEL, C. S.; DANIELLI, N. M.; MELLO, D. F.; BROCARD, C.; MARIS, A. F.; DAFRE, A. L. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquatic Toxicology*, v. 108, n. Proceedings from the 16th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO16), p. 85-93, 2012.
- TWINER, M. J.; CHIDIAC, P.; DIXON, S. J.; TRICK, C. G. Extracellular organic compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* elevate cytosolic calcium and induce apoptosis in Sf9 cells. *Harmful Algae*, v. 4, n. 4, p. 789-800, Jun 2005.

- TWINER, M. J.; DIXON, S. J.; TRICK, C. G. Extracellular organics from specific cultures of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) irreversibly alter respiratory activity in mammalian cells. *Harmful Algae*, v. 3, n. 2, p. 173-182, Apr 2004.
- TWINER, M. J.; TRICK, C. G. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. *Journal of Plankton Research*, v. 22, n. 10, p. 1961-1975, Oct 2000.
- VELKOV, T.; CHUANG, S.; WIELENS, J.; SAKELLARIS, H.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H.; SCANLON, M. J. The Interaction of Lipophilic Drugs with Intestinal Fatty Acid-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 18, p. 17769-17776, May 6, 2005 2005.
- WANG, D. Z. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Marine Drugs*, v. 6, n. 2, p. 349-371, Jun 2008.
- WASHBURN, B. S.; BADEN, D. G.; GASSMAN, N. J.; WALSH, P. J. Brevetoxin: Tissue distribution and effect on cytochrome P450 enzymes in fish. *Toxicon*, v. 32, n. 7, p. 799-805, 1994.
- WIKFORS, G. H.; HÉGARET, H.; GALIMANY, E.; SUNILA, I.; SOUDANT, P.; SHUMWAY, S. E. Hemocyte responses in bivalve molluscs exposed to harmful or toxic algae: Overview and preliminary synthesis. *Journal of Shellfish Research*, v. 27, n. 4, p. 1063-1063, Aug 2008.