

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

**Respostas hemato-imunológicas e histológicas de *Phacoides pectinatus* frente à
infecção por *Vibrio parahaemolyticus***

Beatris Rosalina Michels

Araquari, 2024

Beatris Rosalina Michels

**Respostas hemato-imunológicas e histológicas de *Phacoides pectinatus* frente à
infecção por *Vibrio parahaemolyticus***

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Delano Dias Schleder

Coorientadora: Jillian Petersen

Araquari, 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

MM623R Michels, Beatris Rosalina
r Respostas hemato-imunológicas e histológicas de
Phacoides pectinatus frente à infecção por Vibrio
parahaemolyticus / Beatris Rosalina Michels;
orientador Delano Dias Schleder ; coorientador
Jillian Petersen. -- Araquari, 2024.
60 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Araquari, , Araquari, 2024.

Inclui referências.

1. Phacoides pectinatus. 2. quimiossimbiose. 3.
sistema imune inato. 4. resposta à infecção. I.
Schleder , Delano Dias, II. Petersen, Jillian. III.
Instituto Federal Catarinense. . IV. Título.

BEATRIS ROSALINA MICHELS

**RESPOSTAS HEMATO-IMUNOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS DE *PHACOIDES*
PECTINATUS FRENTE À INFECÇÃO POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS***

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal) e aprovada em sua forma final pelo curso de Mestrado em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari.

Documento assinado digitalmente
 **DELANO DIAS SCHLEDER**
Data: 27/08/2024 18:40:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Delano Dias Schleder,
Dr Instituto Federal
Catarinense

Prof.^a Jillian Petersen

Universität Wien

Documento assinado digitalmente
 **IVAN BIANCHI**
Data: 26/08/2024 14:14:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Ivan Bianchi, Dr.

Coordenador Mestrado Produção e Sanidade Animal Instituto Federal Catarinense

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Scheila Anelise Pereira Dutra, Dra
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Danielle Ferraz Mello
Université de Bretagne Occidentale

Araquari, 2024

Beatris Rosalina Michels

**Respostas hemato-imunológicas e histológicas de *Phacoides pectinatus* frente à
infecção por *Vibrio parahaemolyticus***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 26/07/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Delano Dias Schleder (Orientador)

Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição de vínculo: Instituto Federal Catarinense campus Araquari

Profa. Dra. Jillian Petersen (Coorientadora)

Doutora em microbiologia pela Universidade de Bremen, Alemanha

Instituição de vínculo: Universität Wien

Profa. Dra. Danielle Ferraz Mello

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição de vínculo: Université de Bretagne Occidentale

Profa. Dra. Scheila Anelise Pereira Dutra

Doutora em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Santa Catarina

Agradecimentos

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Dr. **Delano Dias Schleder** por me proporcionar uma oportunidade tão surpreendente e especial que foi ser sua orientada. O professor Delano é extremamente sincero, prático, inteligente e é um dos pesquisadores mais excepcionais que já conheci. Ele nunca se dá por vencido, é muito exigente para com os seus, mas, acredito que a exigência maior dele é consigo mesmo, características que fazem dele uma pessoa brilhante. Eu sempre tento fazer o exercício de ler o mundo científico com seus olhos e me pergunto “O que ele faria nesta situação?”, embora ainda tenha muito a aprender para agir e ser mais como ele, sem dúvidas, é uma das figuras mais inspiradoras para mim. Muito obrigada, professor!

I thank my co-supervisor, Dr. **Jillian Petersen**, from the University of Vienna, for her valuable contribution to this work. It has been an honor to have the counseling of someone with such expertise in the field. I am especially grateful for the guidance and insights that were crucial to the development of this research

Ao veterinário histopatologista **Dr. Javier Adolfo Sarria Perea**, pelas incontáveis horas no laboratório, por sua dedicação incansável e, especialmente, por sua capacidade ímpar em me acalmar e tornar esse processo divertido.

Aos professores, técnicos e colegas de pesquisa, meu sincero agradecimento. Em especial, às técnicas de laboratório **Jaqueline Inês Alves de Andrade** e **Adriana Garcia**, pela ajuda inestimável no dia a dia. Agradeço também aos bolsistas **Maisa Borges**, **Amanda Trentini**, **Cristian Isaac Barbosa** e **Isadora Rosendo** por embarcarem comigo nesta pesquisa. Aos colegas de mestrado **Alex Silva Marquezi** e **Vitor Mendes Lehmkuhl**, sou grata pela oportunidade de aprender com seus experimentos e pela contribuição ao meu próprio trabalho. Aos professores **Adolfo Jatobá Medeiros Bezerra**, **Juliano Santos Gueretz**, **Ivan Bianchi**, **Vanessa Peripolli**, **Fabiana Moreira** e **Monike Quirino**, agradeço a colaboração, apoio e valiosas contribuições ao longo deste projeto. Cada um, a seu modo, deixou uma marca única neste trabalho, e nutro amizade e profundo carinho por todos.

Aos pesquisadores do laboratório LCM-UFSC, obrigada pelo caloroso acolhimento. Ao **Felipe Nascimento Vieira**, por permitir que eu fizesse parte do LCM durante meu estágio extracurricular e pela cuidadosa orientação. A **Scheila Anelise Pereira Dutra** e **Claudia Machado**, pela maestria em ensinar, por expandirem minhas perspectivas a respeito da ciência e pela agradável companhia. Aos amigos de laboratório **Flávio Arruda**, **Ramon Felipe Siqueira Carneiro** e **Luciano Souza do Nascimento** pela troca e por tornar tudo muito mais leve. Todo período que passei com vocês foi enriquecedor.

À agência de fomento **FAPESC**, agradeço pela oportunidade, pela confiança em minha pesquisa e pelo compromisso sério com a pesquisa no Brasil.

À Fundação **FIOCRUZ**, agradeço pelo empréstimo de equipamentos, pelo acolhimento e pela assistência prestada.

Aos meus pais **Marilene de Oliveira Michels** e **Silvano Luís Michels**. Embora o incentivo direto aos estudos não fosse uma parte proeminente de nossa dinâmica familiar, sua constante presença e apoio emocional foram inestimáveis. Suas palavras de incentivo, amor e exemplo de dedicação à família fortaleceram minha jornada, mesmo nos momentos mais desafiadores. Agradeço-lhes por terem moldado meu caráter, ensinando-me valores fundamentais que serviram como alicerce para minha educação e crescimento pessoal. Nos altos e baixos desta jornada, sei que posso sempre contar com o amor e apoio de vocês.

A minha irmã **Bianca Maria Michels de Barcelos** por ser a minha maior incentivadora, tradutora e revisora. Foi por causa dela que desejei estudar, por invejar sua inteligência, sua eloquência e sua ambição. Ela é a pessoa que mais admiro no mundo e por quem tenho mais orgulho. Também agradeço ao meu cunhado **Nilemar de Barcelos**, por cuidar tão bem dela e por me ajudar em tantas traduções. Agradeço também ao meu sobrinho **Thomas Michels de Barcelos** (*in memoriam*) por encher meu coração de alegria e amor.

As minhas melhores amigas, cujo eu as chamo de amigas base, pois já estão comigo há muitos e muitos anos **Bruna Helena Rech** e **Letícia Schatzmann**, por não me deixarem desistir, por me amarem do jeito mais puro, sem cobranças, sem julgamentos, sem tantas projeções e expectativas. A vida é muito mais colorida com vocês.

A minha grande amiga e companheira de apartamento, **Maria Eduarda da Costa**, por ser minha terapeuta, cozinheira, por cuidar do nosso cachorro *cheetos* e da nossa gatinha *dora*, por fazer do nosso lar um lugar seguro e acolhedor, para onde eu sempre quero voltar.

Poucos dias sem ela tornam os dias cinzas, nossa casa sem vida e eu sempre sinto saudade. Madu foi uma das melhores surpresas da minha vida nos últimos anos.

Aos meus amigos **Marcos Vicente da Maia Júnior** e **Vinícius Macedo**, ambos são amigos de longa data e tomaram um rumo de vida um pouco parecido com o meu, academicamente. A experiência de vocês foi muito importante na minha trajetória, os conselhos, o incentivo e especialmente, a honestidade brutal que tiveram comigo. Isso moldou minha postura e isso foi um presente muito valioso.

Ao meu amado, **David Claro Dias**. Sempre que conquisto algo, ele é a primeira pessoa para quem quero contar, ele também é meu ombro favorito para chorar. Ele me encoraja, escuta, apoia, elogia, anima e, talvez o mais importante, me é exemplo. Sua resiliência e sua forma destemida de encarar as adversidades me transformam constantemente. Sua contribuição foi fundamental para que esse trabalho fosse possível. Obrigada por apostar em mim, ainda iremos compartilhar muitas realizações juntos, o futuro é nosso!

Por fim, agradeço a **Deus**. Alguém que reencontrei depois de muitos anos, depois de muito tempo renegando sua presença em minha vida. Deus não permitiu que eu paralisasse ao me tranquilizar e me mostrar, que afinal de contas, o caminho não era assim tão difícil quanto eu pensava. Agora entendo que meu fascínio pela natureza e por entender como ela se desdobra e minha devoção por Deus não são antagônicos.

Resumo

MICHELS, Beatris Rosalina. **Respostas hemato-imunológicas e histológicas de *Phacoides pectinatus* frente à infecção por *Vibrio parahaemolyticus***. 2024. xf. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2024.

Animais invertebrados desafiam os limites ao estabelecer e manter relações complexas com microrganismos, utilizando-se apenas do sistema imune inato. A espécie de bivalve lucínídeos *Phacoides pectinatus* apresenta uma relação simbiótica altamente específica e provavelmente obrigatória com bactérias endo simbiontes quimiossintéticas. O estudo das respostas imunológicas desse molusco aprofundará a compreensão da espécie, além de ter potencial de revelar os mecanismos inerentes ao sistema imunológico inato dos invertebrados aquáticos. Este estudo almejou: 1) padronizar as estruturas e condições necessárias para a manutenção do molusco *P. pectinatus* em laboratório; 2) desenvolver um protocolo de extração e isolamento de bactérias simbióticas; e 3) avaliar o impacto do desafio com a cepa *V. parahaemolyticus* sobre a sobrevivência e respostas hemato-imunológicas e histológicas de *P. pectinatus*. Para determinar as condições ótimas para o manejo em laboratório, foram investigados três ambientes com salinidade constante de 20 ppt (2%) e temperatura entre 23-25°C, sendo um ambiente apenas com água, um com uma camada fina de substrato, areia e água e um com uma camada espessa de substrato, areia e água, avaliar sua influência na manutenção da espécie. Para extração e isolamento de bactérias simbióticas, foram testados diferentes protocolos variando a constituição do meio, higienização e maceração do tecido, temperatura de incubação, e métodos de enriquecimento bacteriano. Para avaliar o potencial patogênico de *V. parahaemolyticus* para *P. pectinatus*, foi realizado um desafio bacteriano intramuscular com três tratamentos: 0 (apenas solução salina estéril), $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. As condições ideais para manutenção de *P. pectinatus* em laboratório foram com água salobra (20 ppt), areia e uma camada com 10 cm de profundidade de lodo do mangue, proporcionando um ambiente estável e de fácil manejo. Foram identificadas apenas as cepas *Pseudomonas oleovorans*, *Shewanella baltica*, *Acinetobacter johnsonii*, e *Shewanella baltica*, nenhuma delas sendo a cepa simbiótica. Foram realizadas coletas de hemolinfa após 1 e 5 dias de desafio. Após sete dias de desafio, as concentrações de $1,5 \times 10^4$ e 10^8 resultaram em 50% e 100% de mortalidade, e impactaram significativamente nos parâmetros hemato-imunológicos e na integridade tecidual das brânquias (órgão que abriga as bactérias simbióticas), quando comparados a animais do tratamento controle.

Palavras-chave: *Phacoides pectinatus*; quimiossimbiose; sistema imune inato; resposta à infecção.

Abstract

MICHELS, Beatris Rosalina. **Hemato-immunological and histological responses of *Phacoides pectinatus* to *Vibrio parahaemolyticus* infection.** 2024. xf. Dissertation (Master of Sciences) - Postgraduate Course in Animal Production and Health, Dean of Research, Graduate Studies and Innovation, Federal Institute of Santa Catarina, Araquari, 2024.

Invertebrate animals challenge the limits by establishing and maintaining complex relationships with microorganisms, using only their innate immune system. The lucinid bivalve species *Phacoides pectinatus* presents a highly specific and likely obligatory symbiotic relationship with chemosynthetic endosymbiotic bacteria. The study of the immune responses of this mollusk will deepen the understanding of the species, as well as potentially reveal the mechanisms inherent to the innate immune system of aquatic invertebrates. This study aimed to: 1) standardize the structures and conditions necessary for maintaining the mollusk *P. pectinatus* in the laboratory; 2) develop a protocol for the extraction and isolation of symbiotic bacteria; and 3) evaluate the impact of the challenge with the strain *V. parahaemolyticus* on the survival and hemato-immunological and histological responses of *P. pectinatus*. To determine the optimal conditions for laboratory management, three environments were investigated with a constant salinity of 20 ppt (2%) and a temperature between 23-25°C: one environment with water only, one with a thin layer of substrate, sand, and water, and one with a thick layer of substrate, sand, and water, to evaluate their influence on species maintenance. For the extraction and isolation of symbiotic bacteria, different protocols were tested by varying the medium composition, tissue hygiene and maceration, incubation temperature, and bacterial enrichment methods. To evaluate the pathogenic potential of *V. parahaemolyticus* for *P. pectinatus*, a challenge was conducted with three treatments: 0 (only sterile saline solution), 1.5×10^4 CFU mL⁻¹, and 1.5×10^8 CFU mL⁻¹. The ideal conditions for maintaining *P. pectinatus* in the laboratory were with brackish water (20 ppt), sand, and a 10 cm deep layer of mangrove mud, providing a stable and easily manageable environment. The strains *Pseudomonas oleovorans*, *Shewanella baltica*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Shewanella baltica* were identified, none of which were the symbiotic strain. Hemolymph samples were collected after 1 and 5 days of challenge. After seven days of challenge, concentrations of 1.5×10^4 and 10^8 resulted in 50% and 100% mortality, respectively, and significantly impacted the hemato-immunological parameters and tissue integrity of the gills (the organ that houses the symbiotic bacteria) when compared to animals in the control treatment.

Keywords: *Phacoides pectinatus*; chemosymbiosis; innate immune system; infection response

Lista de Figuras

Figura 1) Diagrama generalizado de parte de um único filamento branquial de *Codakia orbicularis*. **A) Zona intermediária.** Bc, Bacteriócito; bs, espaço sanguíneo; ca, eixo de colágeno do filamento branquial; efc, cílios eulatero-frontais; fc, cílios frontais; gc, granulação celular; ic, célula intermediária; ical, célula intercalar; lc, cílios laterais. **B) *Codakia tigerina*.** Secção através do filamento branquial mostrando (na parte superior) células embaladas com grânulos esféricos com bacteriócitos abaixo. Barra de escala, 10 µm. b, Bactérias nos bacteriócitos; gc, célula de grânulos (Taylor & Grove, 2000). Fonte: Frenkiel & Moueza (1995, fig. 4). 23

Figura 2) Anatomia geral *P. pectinatus* com o manto esquerdo removido para mostrar a fileira de brânquias do manto posicionadas ao lado do músculo adutor anterior. Pa, músculo adutor posterior; Exa, abertura exalante; Ia, abertura inalante; M, manto; F, pé; Mg, brânquias; Aa, músculo adutor anterior; Ct, ctenídeos; K, rim. Fonte: John D. Taylor & Emily A. Glover, (2014, fig 12). 25

Figura 3) Taxa de sobrevivência final (%) de moluscos *P. pectinatus* após a infecção com *V. parahaemolyticus*. 42

Figura 4) Corte transversal de demibrânquia normal de *P. pectinatus*, aumento 400X. (a) filamentos lamelares o (b) células hemolinfáticas, (c) a diferença da lacuna sanguínea do espaço interfilamentoso. Adicionalmente é possível observar os prolongamentos digitiformes filamentos frontais (seta vermelha) e abfrontais (seta azul) septo (seta preta). 46

Figura 5) Alterações nas demibrânquias de *P. pectinatus* após desafios com *V. parahaemolyticus*. a=filamento lamelar; b=lacuna hemolinfática; c=septo; seta azul = prolongamento digitiforme filamentar abfrontal; seta vermelha = prolongamento digitiforme filamentar frontal. A) 24 horas após desafio com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹: intensa hiperplasia de células mucosas nos prolongamentos digitiformes abfrontais com alisamento da borda e congestão celular intensa nas lacunas hemolinfáticas; B) 120 horas após desafio com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹:a hiperplasia de células mucosas diminui nos prolongamentos digitiformes abfrontais, voltando estes à sua configuração normal, mas a congestão celular nas lacunas hemolinfáticas permanece; C) 24 horas após desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹: extensa

hiperplasia de células mucosas nos prolongamentos digitiformes abfrontais com alisamento da borda e congestão celular intensa nas lacunas hemolinfáticas; D) 120 horas após desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹: Note-se a extensa hiperplasia de células mucosas e alisamento dos prolongamentos digitiformes abfrontais, com forte aderência entre as bordas abfrontais e total colapamento do espaço interlamelar. As bordas lamelares parecem estar unidas por uma camada de tecido conectivo denso.....47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros hemato-imunológicos de <i>P. pectinatus</i> após 24h e 120h de desafio com <i>V. parahaemolyticus</i> , nas concentrações 1.5×10^4 e 1.5×10^8 UFC mL ⁻¹ , tendo como controle animais inoculados com solução salina estéril.	43
Tabela 2 - Histopatologia: alterações nas brânquias após 24h e 120h de desafio com <i>V. parahaemolyticus</i> , nas concentrações 1.5×10^4 e 1.5×10^8 UFC mL ⁻¹ , tendo como controle animais inoculados com solução salina estéril.....	49
Tabela 3 - Identificação das bactérias isoladas em meio de cultura não seletivo (isolados 1 a 5) e seletivo (isolados 6 e 7).	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

1 O ₂	Oxigênio singlete
ANOVA	Análise de variância
βGBP	B-1,3-glicanas
BSA	Bovine serum albumin, albumina de soro bovino
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cm	Centímetros
DHC	<i>Differential hemocytes count</i> – contagem diferencial de hemócitos
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucléico
Dscam	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i> , molécula de adesão celular da síndrome de Down
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i> , ácido diamino tetracético
Erro	Espécies reativas de oxigênio
FREPs	Fibrinogenrelated proteins
G	Gravidade
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
HbI	Hemoglobina I (reativa ao sulfeto de hidrogênio - H ₂ S)
HbII	Hemoglobina II (reativa ao oxigênio - O ₂)
HbIII	Hemoglobina III (reativa ao oxigênio - O ₂)
HE	Hematoxilina e Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBS	<i>Iron-blooded serum</i> , soro ferro-sanguíneo
Indels	<i>Insertion-deletions</i> , inserções e deleções de nucleotídeos no DNA
L	Litros
L-Dopa	Dihidroxifenilalanina
M	Molar
MAS	<i>Modified Alsever solution</i> , solução de Alsever modificada
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
CaCl ₂	Cloreto de sódio
NADPH nm	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NANA	Ácido N-acetil-neuramínico
O ₂	Oxigênio
O ₂ –	Nanômetro
°C	Ânion superóxido
OH-	Radical hidroxila
ONOO-	Radical hidroxil
p	Peroxinitrito
PAM	Peptídeos antimicrobianos
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> , padrões moleculares associados à patógenos.
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> , tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
PGRP	Proteínas de reconhecimento de peptidoglicana
pH	Phosphate buffer solution, tampão fosfato salino
PL	Potencial hidrogeniônico Plasma
PO	Fenoloxidase
PPT	Partes por Trilhão
Propor	Pró-fenoloxidase
PRP	Padrões moleculares específicos
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SOD	Superóxido dismutase
TBS	<i>Tris buffer solution</i> , tampão de Tris salino
TEPs	Proteínas contendo tioéster
THC	<i>Total Hemocytes Count</i> – contagem total de hemócitos
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1	Aspectos gerais: Classe Bivalvia e Família Lucinidae	18
1.2	Aspectos do Cultivo de Moluscos Bivalves no Brasil e no Mundo	20
1.3	Respostas Hemato-imunológicas em Bivalves	25
1.3.1	Reconhecimento do não próprio em bivalves: Proteínas de Reconhecimento-Padrão (PRPs)	27
1.4	Resposta imunológica celular e humoral	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Geral.....	32
2.2	Específicos.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Padronização de estruturas para manutenção de <i>P. pectinats</i> em laboratório.....	33
3.2	Coleta de hemolinfa	34
3.3	Contagem total de células (THC)	34
3.4	Contagem diferencial de células (DHC)	34
3.5	Atividade aglutinante	35
3.6	Atividade da fenoloxidase (PO)	35
3.7	Concentração proteica	36
3.8	Processamento histológico.....	36
3.9	Infecção bacteriana experimental	36
3.9.1	Inóculo bacteriano.....	36
3.9.2	Desafio experimental.....	37

3.9.3	Coleta de amostras e análises.....	37
3.10	Desenvolvimento de protocolo para isolamento das bactérias endossimbiontes	38
3.10.1	Isolamento das bactérias endossimbiontes com meio de cultura não seletivo	38
3.10.2	Isolamento das bactérias endossimbiontes associando ao protocolo de enriquecimento bacteriano com a utilização de meio de cultura seletivo para cepas marinhas.....	39
3.11	Estatística	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Padronização de estruturas para manutenção de <i>P. pectinats</i> em laboratório.....	41
4.2	Desafio experimental.....	41
4.3	Parâmetros hemato-imunológicos	42
4.3.1	Contagem total e diferencial de hemócitos	42
4.3.2	Concentração proteica	43
4.3.3	Atividade da fenoloxidase (PO)	43
4.3.4	Título Aglutinante.....	43
4.3.5	Atividade antimicrobiana	43
4.4	Análise histomorfológicas das brânquias	44
4.4.1	Controles: descrição da morfologia normal da demibrânquia	44
4.4.2	Tratamento: 1.5×10^4 UFC mL ⁻¹	44
4.4.3	Tratamento: 1.5×10^8 UFC mL ⁻¹	45
4.5	Isolamento das bactérias endossimbiontes com meio de cultura não seletivo	58
4.6	Discussão	59
5	CONCLUSÃO.....	63
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
	REFERENCIAS	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos gerais: Classe Bivalvia e Família Lucinidae

O Filo Mollusca é o segundo mais diverso grupo de animais, com cerca de 130.000 espécies descritas, sendo aproximadamente 50.000 destas provenientes de ambientes marinhos (Chapman et al., 2009). Dentre as classes, a Bivalvia é a segunda maior deste filo, compreendendo cerca de 7.500 espécies (Ruppert et al., 2004; Gosling, 2015; Zhang, 2013). Os bivalves apresentam distribuição mundial e habitam uma variedade de ambientes marinhos, salobros e dulcícolas, incluindo os estuários, mares, rios, praias arenosas e costões rochosos (Gosling, 2004; Newell, 2004). Com frequência, constituem a principal macrofauna em substratos rochosos de regiões litorâneas rasas e profundas (Lutz E Kennish, 1993; Gosling, 2003).

Anatomicamente, os bivalves são animais comprimidos dorso-lateralmente e possuem uma concha composta por duas valvas que se articulam dorsalmente e envolvem todo o corpo mole do animal (Galtsoff, 1964; Ruppert et al., 2004). As conchas dos bivalves são formadas pela deposição contínua do nácar por células especializadas do manto do molusco, proporcionando alta dureza e rigidez, além de servir como primeira barreira contra parasitos e predadores (Galtsoff, 1964; Gosling, 2004; Silva et al., 2010). Os bivalves, em geral, possuem dois músculos adutores (anterior e posterior) que controlam a abertura e fechamento das valvas (GOSLING, 2015). São animais filtradores que coletam o alimento da água por meio do batimento ciliar branquial, promovendo a criação de um fluxo de água na cavidade palial e aprisionando partículas orgânicas e microrganismos no muco secretado pelo epitélio branquial (Seibert, 2002).

A maioria dos bivalves está exposta a um ambiente com elevada carga de microrganismos, patogênicos ou não, bem como a condições potencialmente estressantes, tais como variação de maré, exposição ao ar, temperaturas extremas, níveis subótimos de compostos e entre outros. Para tanto, estes animais desenvolveram estratégias eficazes para prevenir e se evadir dos impactos dos patógenos e dos estresses ambientais (Loker et al., 2004). Os hemócitos, células centrais no sistema imunológico dos bivalves, desempenham um papel crucial na defesa contra infecções (Cheng, 1981).

Os hemócitos são descritos como células circulantes que desempenham papéis críticos na imunidade, incluindo reconhecimento de patógenos, fagocitose, melanização e defesa antimicrobiana. Além disso, o estudo busca identificar diferentes subpopulações de hemócitos com funções específicas, o que pode melhorar a compreensão das respostas imunes em crustáceos (Söderhall et al., 2022).

Adicionalmente, a classe Bivalvia é constituída por mais de 100 famílias, dentre estas várias famílias de bivalves, inclui-se as famílias Lucinidae, Thyasiridae, Solemyidae, Mytilidae, Vesicomidae e Teredinidae, as quais exibem interação simbiótica com bactérias oxidantes de sulfeto e, menos comumente, bactérias oxidantes de metano. A família Lucinidae é de longe a mais distinta, rica em espécies e geograficamente difundida entre essas famílias de bivalves (Taylor & Glover, 2006).

Os lucínídeos são uma família antiga de bivalves que existe há cerca de 500 milhões de anos, e ocupam uma ampla gama de habitats, desde ambientes costeiros até o mar profundo, sendo abundantes no Brasil (Taylor e Glover, 2006). Todos os moluscos lucínídeos apresentam uma relação simbiótica altamente específica e obrigatória com uma ou mais espécie de bactérias quimiossintetizantes. Essas bactérias aproveitam a energia do sulfeto encontrado em seus habitats e usam isso para converter dióxido de carbono em açúcares para se alimentar e alimentar seu hospedeiro (Dubilier et al., 2008).

Os moluscos lucínídeos são conhecidos por serem espécies infaunais, habitando sedimentos sulfídicos onde estabelecem relações de quimiosimbiose com bactérias oxidantes de enxofre. Essa adaptação permite que eles prosperem em ambientes de baixa diversidade, utilizando o sulfeto presente no sedimento como fonte de energia para a fixação de carbono. Estudos recentes demonstram que todos os gêneros modernos de lucínídeos hospedam simbiontes e vivem em tais condições, refletindo uma estratégia de vida que remonta aos primeiros lucínídeos ancestrais (Bryant et al., 2023).

Embora sejam mais comumente encontrados em sedimentos marinhos rasos, os lucínídeos ocupam uma ampla gama de habitats desde a zona entre-marés até profundidades de mais de 2100 m. Esses bivalves podem ocorrer em lamas de mangue, lamas e areias entre marés e *offshore*, leitos de ervas marinhas e locais de alto aporte orgânico, como locais de descarte de esgoto. Existem algumas espécies que estão associadas a infiltrações frias e vulcões de lama, e uma única espécie conhecida de fontes hidrotermais.

A maior diversidade de lucinídeos é encontrada nos ambientes Indo-Oeste do Pacífico e recifes do Atlântico, onde muitas espécies habitam areias calcárias (Taylor & Glover, 2006).

Devido à sua adaptação a diversos ambientes e interações simbióticas, os bivalves da família Lucinidae exemplificam a complexidade ecológica da classe Bivalvia, o que também se reflete no cultivo comercial de espécies como vieiras, ostras, mexilhões e *clams*.

1.2 Aspectos do Cultivo de Moluscos Bivalves no Brasil e no Mundo

As principais espécies de moluscos bivalves para o comércio internacional são vieiras, ostras, mexilhões e *clams* (berbigões, amêijoas e entre outros). Atualmente, a maioria dos bivalves consumidos é cultivada em países europeus, América do Norte, China e Chile. A União Europeia, os Estados Unidos, China e Coreia do Sul são os maiores importadores. A demanda por bivalves tem se mantido estável, com uma percepção positiva entre os consumidores como alimento saudável e sustentável. Em 2020, as exportações globais de bivalves somaram USD 4,3 bilhões, representando cerca de 2,8% do valor total das exportações de produtos aquáticos (FAO, 2022).

No Brasil, o estado de Santa Catarina sobressai como o principal polo da produção de moluscos de cultivo. Com mais de 95% da produção nacional concentrada neste estado, essa proporção tem se mantido praticamente constante desde 2013. Enquanto Santa Catarina lidera a produção, outros nove estados também apresentam atividades significativas na produção de moluscos, conforme indicado pelos dados do IBGE (Figura 1).

Em 2020, no estado de Santa Catarina registrou um total de 478 produtores ativos, o que resultou em uma produção de 16.253 toneladas de moluscos. Os mexilhões lideraram como os organismos mais produzidos, seguidos pelas ostras e com uma produção menor de vieiras. Os bivalves fazem parte da culinária tradicional do estado, e são largamente explorados pelo setor turístico (Duprat, 2020). Além das espécies cultivadas, outros bivalves oriundos do extrativismo são considerados iguarias locais, tais como o berbigão e, em menor escala, o sururu (Palmeira et al., 2016; Duprat, 2020).

As amêijoas, por outro lado, não constituem um item comum da culinária tradicional de Santa Catarina, sendo apenas consumidas por algumas comunidades ribeirinhas. Diferentemente do estado do Paraná, também na região Sul, e dos estados da região Nordeste, como Bahia e Ceará, nos quais o consumo é mais frequente, tanto por parte das

comunidades locais quanto do setor turístico (Tavares et al., 2021).

Enquanto o cultivo de bivalves em Santa Catarina se concentra em mexilhões e ostras, a espécie *Phacoides pectinatus* também desempenha um papel importante na região devido à sua presença natural e valor econômico para as comunidades locais.

Phacoides pectinatus: classificação, distribuição geográficas e morfofisiologia

Classificação taxonômica:

- Filo: Mollusca
- Classe: Bivalvia
- Subclasse: Heterodonta
 - Ordem: Lucinida
 - Superfamília: Lucinoidea
 - Família: Lucinidae
 - Subfamília: Lucininae
 - Gênero: *Phacoides*
 - Espécie: *Phacoides pectinatus* (Gmelin, 1791)

A espécie *P. pectinatus* (sinonímia *Lucina pectinata*) é um molusco lucínídeo que vive enterrado, infaunal, (10 a 20 cm) em lamas ricas em sulfetos frequentemente associadas a manguezais no Atlântico ocidental, estendendo de Santa Catarina, sul do Brasil, à Carolina do Norte, EUA (Williams et al., 2004; Rios, 2009).

No Brasil, a espécie é popularmente conhecida como “almeja”, “amêijoa” ou “lambreta”, é um importante recurso econômico para as comunidades locais ao longo da costa brasileira, pois é uma iguaria culinária importante que vem sendo amplamente coletada para subsistência, para consumo e venda em mercados locais e regionais (Rondinelli e Barros, 2010; Christo et al., 2016).

A comunidade pesqueira de entorno da Baía da Babitonga, litoral norte de Santa Catarina, relatou que as almejas (*P. pectinatus*) eram muito abundantes há 15 anos na Baía. No entanto, devido à sobrepesca e um derramamento de óleo causado por um acidente com uma barcaça na baía no início dos anos 2000, eles se tornaram escassos (comunicações pessoais).

Do ponto de vista filogenético, Williams et al. (2004) investigando as relações filogenéticas dentro da superfamília Lucinoidea, classificou *P. pectinatus* como um gênero profundamente ramificado com relação distante com todas as outras espécies de lucínídeos. Taylor e Glover (2006) relataram que esta espécie possui características peculiares, como muitos pequenos *indels* (inserções e deleções de bases no DNA, que podem afetar a estrutura genética) e alterações de base não compartilhadas com outros lucínídeos. Além disso, *P. pectinatus* pode ser a única espécie viva do gênero, e sua classificação é controversa, por exemplo, foi classificada pela primeira vez como *Lucina pectinata*, porém este sinônimo não é mais aceito.

O ciclo reprodutivo desta espécie é possivelmente contínuo ao longo do ano, uma vez que exemplares com gônadas maduras, geralmente com tamanho de 40 mm ou mais, foram encontrados ao longo das estações de verão, outono e inverno (Ribeiro et al., 2018). Infelizmente, este estudo não coletou espécimes durante a primavera, para confirmar se realmente tem um ciclo reprodutivo contínuo.

Como outros lucínídeos investigados, as bactérias simbióticas quimiossintéticas de *P. pectinatus* são encerradas em vacúolos de membrana dentro de bacteriócitos. Seus bacteriócitos apresentam várias características estruturais com um padrão de distribuição espacial consistente do polo apical ao basal. O polo apical é ocupado por numerosos simbiontes bacterianos envacuolados, e na parte basal encontra-se o núcleo, corpos lisossômicos, pequenas vesículas, zonas contendo hemoglobina e depósitos elementares de enxofre (Lechaire et al., 2006).

Embora a estrutura detalhada dos ctenídios varie entre os gêneros, o plano básico é semelhante em todos os lucínídeos examinados. Os ctenídios consistem apenas em demibrânquias internas, que são grandes e espessas em comparação com a maioria dos outros bivalves heterodontes.

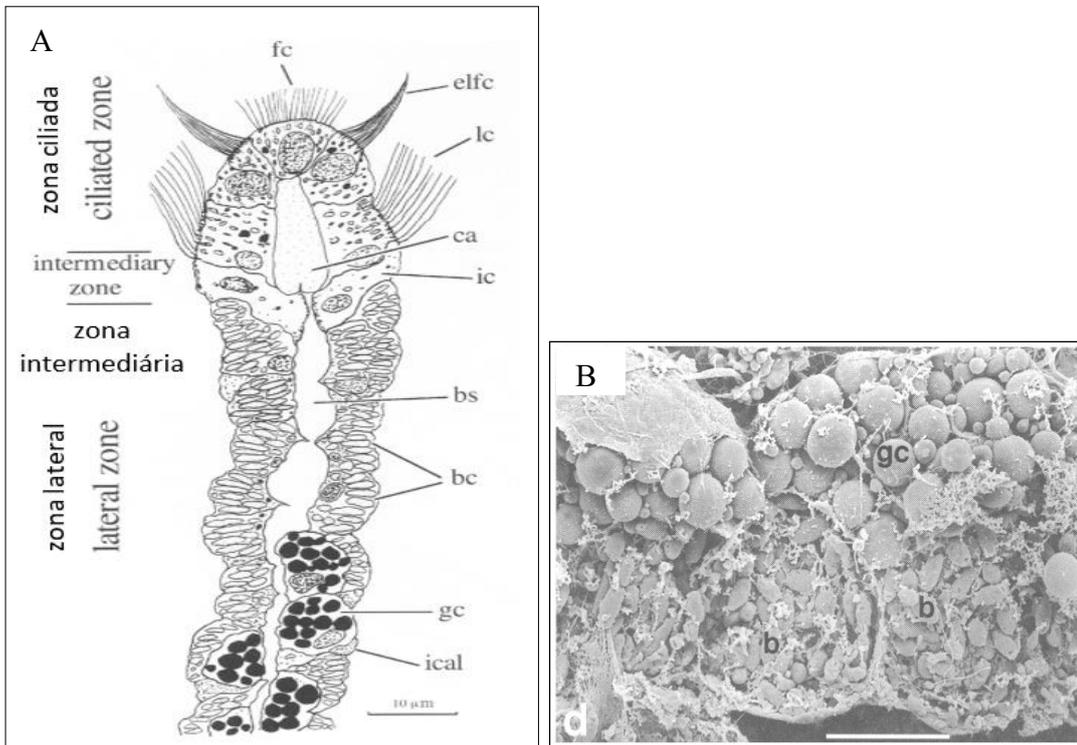


Figura 1) Diagrama generalizado de parte de um único filamento branquial de *Codakia orbicularis*. **A) Zona intermediária.** Bc, Bacteriócito; bs, espaço sanguíneo; ca, eixo de colágeno do filamento branquial; efc, cílios eulatero-frontais; fc, cílios frontais; gc, granulação celular; ic, célula intermediária; ical, célula intercalar; lc, cílios laterais. **B) *Codakia tigerina*.** Secção através do filamento branquial mostrando (na parte superior) células embaladas com grânulos esféricos com bacteriócitos abaixo. Barra de escala, 10 μm . b, Bactérias nos bacteriócitos; gc, célula de grânulos (Taylor & Grove, 2000). Fonte: Frenkiel & Moueza (1995, fig. 4).

Todos os lucinídeos possuem um sulco alimentar ventral raso, os filamentos individuais compreendem uma estreita zona ciliada com cirros frontais, eulatero-frontais e cílios laterais semelhantes aos de outros bivalves (Figura 1 A e B). Dentro dela está uma zona intermediária de várias células grandes, seguido pela zona espessa de bacteriócitos de tecido subfilamentar (Taylor & Glover, 2000).

Os bacteriócitos apresentam simbiontes bacterianos envacuolados, que geralmente são em forma de bastonete. Frequentemente, as bactérias estão alinhadas com seus longos eixos normais à superfície epitelial coberta por microvilosidades. Células intercalares estreitas separam os bacteriócitos e extensões laterais deles frequentemente se sobrepõem à superfície externa das células bacteriócitos (Frenkiel e Mouza, 1995).

Mucócitos ocasionais ocorrem entre os bacteriócitos. A função das células intercalares é desconhecida, mas tem sido objeto de alguma especulação. As células intercalares são geralmente estreitas na base e alargadas distalmente em extensões laterais.

Estes frequentemente se sobrepõem aos ápices das células bacteriócitos para formar uma 'cobertura' parcial que levou a sugestões de que eles podem funcionar para restringir periodicamente o contato dos bacteriócitos com a água do mar dentro da cavidade do manto (Distel & Felbeck, 1987).

Embora a estrutura dos filamentos branquiais tenha sido bem descrita, existem muitos problemas pendentes relativos à simbiose. Particularmente intrigante é a variedade de grânulos observada em células da zona de bacteriócitos de diferentes lucinídeos e o significado funcional destes ainda não foi resolvido. São notáveis os acúmulos de grânulos arredondados (2-5 cm de diâmetro) que preenchem as células dentro da zona de bacteriócitos de alguns gêneros, por exemplo, *Codakia*, *Lucinisca* e *Lucinoma* (Southward, 1986; Gros et al., 1996). Em *C. orbicularis* (Gros et al., 1996), na qual as células granulares são particularmente abundantes, as quais apresentam conteúdo proteico e rico em cisteína, além de compostos sulfurosos observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As células granulares tornam-se mais abundantes com a idade do bivalve e em *C. orbicularis* a zona lateral dos filamentos branquiais torna-se dividida em uma zona superficial de bacteriócitos e uma zona mais profunda dominada por células granulares. Também contidos nas células bacteriócitos estão uma variedade de outros grânulos, alguns dos quais são encontrados enxofre elementar, enquanto outros ferro ou contêm uma variedade de metais. Essa complexidade na composição celular é um indicativo das adaptações morfofisiológicas específicas dos lucinídeos, especialmente em ambientes ricos em sulfetos.

Da mesma forma, *P. pectinatus* possui algumas características morfológicas únicas, como músculo adutor anterior extremamente longo e estreito, extensa fusão do manto, brânquias peculiares do manto e corpos oxidantes de enxofre nas células branquiais, conforme mostra a figura 2 (Liberge et al., 2001; Taylor & Glover, 2006).

Esta espécie apresenta três tipos de hemoglobinas: HbI, reativa ao sulfeto de hidrogênio (H₂S), e HbII e HbIII, ambas reativas ao oxigênio (O₂), que fornecem H₂S e O₂ às bactérias simbióticas quimiossintéticas. A HbI apresenta características únicas em suas sequências gênicas e de aminoácidos e, além de fornecer H₂S ao endossimbionte, parece proteger a respiração celular da toxicidade do sulfeto (Montes-Rodríguez et al., 2016).

Lima et al. (2019) realizaram um estudo aprofundado sobre o microbioma e metatranscriptoma da brânquia de *P. pectinatus* do Atlântico Norte, e revelaram um perfil metabólico distinto de tioautotrofia (processo metabólico que utiliza compostos de enxofre

como fonte de energia), respiração e assimilação de nitrogênio do endossimbionte, quando comparado a outros clados simbiotes de lucinídeos. Os autores corroboraram relatos anteriores sobre a posição filogenética singular do endossimbionte, denominado *Candidatus Sedimenticola endophacoides*, de *P. pectinatus* em relação a outras espécies simbiotes de lucinídeos. Seus dados de transcriptômicos revelaram ainda, outras características peculiares desta espécie simbiótica, ela é adaptada a ambientes pobres em oxigênio e seus simbiotes podem utilizar ureia e amônia como fontes de nitrogênio, e não parecem codificar a via metabólica para a fixação de nitrogênio, que foi descoberto em outros simbiotes lucinídeos (Petersen et al., 2016).

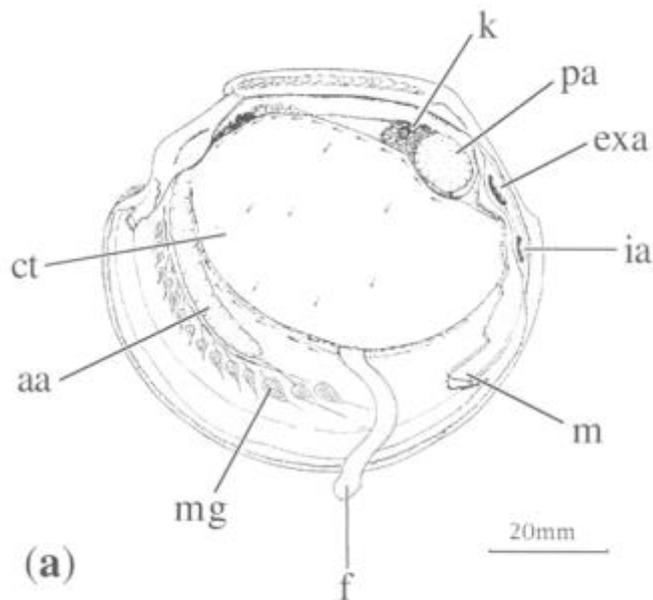


Figura 2) Anatomia geral *P. pectinatus* com o manto esquerdo removido para mostrar a fileira de brânquias do manto posicionadas ao lado do músculo adutor anterior. Pa, músculo adutor posterior; Exa, abertura exalante; Ia, abertura inalante; M, manto; F, pé; Mg, brânquias; Aa, músculo adutor anterior; Ct, ctenídios; K, rim. Fonte: John D. Taylor & Emily A. Glover, (2014, fig 12).

1.3 Respostas Hemato-imunológicas em Bivalves

Os moluscos bivalves, assim como os demais invertebrados, apresentam apenas o sistema imune inato. O componente celular da imunidade destes animais é mediado pelos hemócitos, células móveis que, além de desempenharem funções celulares como a fagocitose, também podem secretar substâncias antimicrobianas e citotóxicas solúveis na

hemolinfa (Barracco & Silva 2008).

Em moluscos bivalves, os hemócitos são abundantes na hemolinfa, com uma contagem de aproximadamente 2-4 milhões de células por mililitro, e têm a capacidade de se mover amplamente pela cavidade corporal. Essas células desempenham papéis importantes no reconhecimento de não-próprio, migração, fixação, endocitose e eliminação de patógenos por meio de intermediários reativos de oxigênio, enzimas e demais compostos antimicrobianos (Söderhall et al., 2022).

Os hemócitos são tradicionalmente categorizados com base em sua morfologia e na presença de grânulos citoplasmáticos, sendo classificados como hialinos (HC, sem grânulos), semigranular (SGC, com poucos e menos densos grânulos) e granulares (GC, com grânulos densos) (Söderhall et al., 2022). A presença destes três tipos celulares não é constante nas diferentes espécies de bivalve, e existem inconsistências e controvérsias nas classificações de hemócitos entre estudos em diferentes espécies da mesma família e até mesmo dentro da mesma espécie. Estudos recentes têm mostrado que a divisão tradicional em HC, SGC e GC é uma simplificação, e há provavelmente mais categorias de hemócitos com funções específicas. A análise de expressão de mRNA em hemócitos revelou que vários genes são expressos apenas em subconjuntos específicos de hemócitos, indicando uma diversidade maior do que se pensava anteriormente (Söderhall et al., 2022).

Deste modo, não existe um sistema de classificação unificado para hemócitos de moluscos bivalves, até o momento. Esta diversidade pode ser em parte devida a algumas diferenças verdadeiras, mas também resultante de: uso de diferentes critérios de classificação ou procedimentos experimentais, fatores endógenos e exógenos, como idade, poluição ou a alta variabilidade interindividual (Ballina et al., 2022). No entanto, essa classificação é importante para estudar as funções específicas de cada tipo de hemócitos (Söderhall et al., 2022).

A despeito do exposto acima, a classificação tradicional de hemócitos granulares e hialinos (ou agranulares), descrito por CHENG (1981), ainda é bastante útil para estudos de caracterização morfo-funcionais de hemócitos de bivalves (Allam; Raftos, 2015).

Os hemócitos granulócíticos distinguem-se pela abundância de grânulos e pela baixa proporção entre núcleo e citoplasma. Eles podem ser uninucleados ou binucleados, com núcleos excêntricos, esféricos ou ovais, e apresentarem grânulos basofílicos ou eosinofílicos. Diferentes estudos sugerem que os granulócitos eosinofílicos são mais ativos e

imunocompetentes que os basofílicos. Em contraste, os hemócitos hialinos são identificados por terem poucos ou nenhum grânulo, sendo geralmente classificados em duas categorias: células indiferenciadas ou blásticas, com uma alta proporção entre núcleo e citoplasma, e células basófilas maiores, semelhantes a macrófagos de vertebrados (Ballina et al., 2022).

Entre as técnicas utilizadas para caracterização de hemócitos, estão as colorações histológicas, análises ultraestruturais e citometria de fluxo (Zang, 2018). Parâmetros hemato-imunológicos, como a contagem total de células (THC) da hemolinfa ou a contagem diferencial de células (DHC) e fagocitose podem ser usados para monitorar a saúde dos bivalves, assim como determinar a qualidade do ambiente onde vivem (Donaghy et al., 2012).

1.3.1 Reconhecimento do não próprio em bivalves: Proteínas de Reconhecimento-Padrão (PRPs)

Os invertebrados marinhos dispõem de variadas proteínas de reconhecimento padrão do não próprio (PRPs). Tais como receptores TOLL-like, proteínas de reconhecimento de peptidoglicana (PGRP), proteínas contendo tioéster (TEPs), proteínas que se ligam a β -1,3-glicanas (β GBP), receptores scavengers, lectinas e entre outras, que reconhecem padrões moleculares presentes na superfície de patógenos (PAMPs), e ativam vias de sinalização específicas desencadeando, assim, respostas imunológicas efetoras (Allan et al, 2015). Dentre as PRPs, destaca-se aqui as lectinas ou aglutininas, que apresentam a capacidade de ligar-se a carboidratos específicos na superfície de células, incluindo microrganismos, promovendo sua aglutinação e opsonização (Vargas-Albores & Barracco, 2001).

As lectinas desempenham um papel crucial na resposta imune, sendo ativadas em resposta à infecção. Esses receptores ligam-se a carboidratos associados a patógenos, desencadeando uma série de eventos que incluem a ativação do complemento e a opsonização. Contribuindo assim para o reconhecimento e a defesa do organismo contra invasores. Estudos indicam que a expressão gênica das lectinas é regulada em resposta às infecções. Por exemplo, Leal et al. (2022) identificaram várias lectinas expressas em cnidários em resposta a patógenos, como a colectina-12, lectinas ligantes de L-ramnose e lectina de tipo C, sugerindo assim que a expressão gênica das lectinas pode desempenhar

um papel crucial na melhoria da resistência contra infecções. Essa regulação da expressão gênica das lectinas pode representar uma estratégia evolutiva para aumentar a eficácia da resposta imune e proteção contra potenciais ameaças microbiológicas (Leal et al., 2022).

As lectinas mediam a seleção de partículas, incluindo bactérias, no muco de bivalves. Elas têm a capacidade de se ligar a microrganismos por meio de interações proteína-carboidrato, influenciando diretamente na seleção e interação com as bactérias presentes no ambiente dos bivalves e respondem a estímulos externos associados à presença de patógenos nos tecidos dos bivalves, destacando seu papel na imunidade de mucosa (Allam et al, 2016).

De acordo com o experimento de Allam et al (2016), que expuseram ostras a um desafio bacteriano (*Vibrio alginolyticus*), observou-se que o aumento significativo de lectinas na mucosa após desafio bacteriano por imersão, o mesmo não ocorreu após inoculação bacteriana intramuscular. Além disso, foram identificadas várias proteínas de reconhecimento imune, incluindo lectinas galactose e manose ligantes, proteínas contendo o domínio C1q e proteínas contendo tioéster, que desempenham papéis importantes na resposta imune de mucosa em bivalves (Allam et al., 2016)

Adicionalmente, Yuen et al (2019) avaliaram o transcriptoma de diferentes órgãos do lucínídeo *Loripes orbiculatus*, e observaram a presença de C-lectinas na massa visceral desta espécie. As C-lectinas presentes no organismo deste animal podem desempenhar funções diversas, como a regulação da seleção de alimentos, semelhante ao observado em outras espécies como o *Crassostrea gigas*, onde essas proteínas são expressas nas superfícies mucosas de órgãos alimentares.

Isso sugere que, as C-lectinas presentes no sistema digestivo do molusco *Loripes orbiculatus*, por exemplo, possam desempenhar um papel na regulação da seleção e incorporação de simbioses, bem como na captura de alimentos. Essas lectinas podem estar envolvidas no reconhecimento de carboidratos, o que aponta que elas podem desempenhar funções tanto na imunidade e homeostase do trato digestivo quanto na regulação da seleção de alimentos e simbioses (Yuen et al, 2019).

Por outro lado, há crescente número de estudos relatando a capacidade de “reconhecimento específico” e “memória” imunológica do sistema imune inato de bivalves, denominado de aprimoramento imunológico (em inglês *immune priming*). Dentre os receptores descritos na literatura, estão as moléculas hipervariáveis como as Dscam (do

inglês, *Down syndrome cell adhesion molecule*) e as proteínas relacionadas ao fibrinogênio FREPs (do inglês *fibrinogen-related proteins*), cuja diversidade molecular está associada à resposta imune específica ao tipo distinto de patógeno (Cerenius & Söderhäll, 2013). Desta forma, os moluscos dispõem de uma plethora de receptores e mecanismos que os permitem estabelecer interações complexas com a comunidade microbiana de entorno.

1.4 Resposta imunológica celular e humoral

Os hemócitos realizam fagocitose para englobar e digerir partículas estranhas, como bactérias, para neutralizá-las. Durante o processo de fagocitose, os hemócitos reconhecem, englobam e internalizam o agente estranho em um fagossomo (Bachère et al., 2015). Após a internalização do agente, o fagossomo passa por um processo de maturação que inclui acidificação e fusão sequencial com compartimentos endossomais e lisossomais. Além disso, ocorre a integração de grânulos contendo uma variedade de substâncias antimicrobianas (Gueguen et al., 2009; Schmitt et al., 2012).

No interior do fagossomo, são liberados compostos microbicidas que conduzem à rápida neutralização ou degradação dos microrganismos endocitados (BACHÈRE et al., 2015). Entre as enzimas hidrolíticas encontradas no fagossomo maduro, destacam-se as lisozimas, que desempenham um papel crucial na destruição microbiana devido às suas propriedades líticas contra as peptidoglicanas presentes na parede bacteriana (HANCOCK; SCOTT, 2000).

Simultaneamente à fagocitose, os hemócitos produzem muitas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Lambere et al., 2003). Estes são potentes agentes microbicidas produzidos por um mecanismo conhecido como choque respiratório ou estresse oxidativo, que resulta em um aumento no consumo de oxigênio pelos hemócitos. O primeiro composto formado é o ânion superóxido (O_2^-), gerado pela redução do oxigênio molecular por meio da ativação da enzima NADPH oxidase, localizada nas membranas celulares. Esse ânion serve como precursor direto ou indireto de outras EROs, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e oxigênio *singlet* (1O_2). Estes compostos são extremamente tóxicos, capazes de causar danos severos às membranas, proteínas e DNA (Abele & Puntarulo, 2004).

A fagocitose captura e destrói bactérias invasoras pelos hemócitos, enquanto os peptídeos antimicrobianos (PAMs) eliminam diretamente os microrganismos patogênicos (Canesi et al., 2022). Juntamente com lisozimas e citocinas, os PAMs contribuem para a

resposta imune dos organismos, eliminando e neutralizando microrganismos invasores. Além disso, os PAMs mantêm a homeostase imunológica e regulam a microbiota associada aos bivalves (Bouallegui, 2019).

Além disso, há diferenças significativas na expressão de diferentes PAMs em tecidos distintos de *Mytilus coruscus*, por exemplo. A análise do transcriptoma revelou que alguns PAMs generalistas, como a defensina-2, a crustina e o MGD, são expressos constitutivamente em vários tecidos analisados, enquanto outros PAMs são restritos a tecidos específicos, como as gônadas, apresentando uma expressão marcante (Yang et al., 2022).

A regulação diferencial de PAMs em resposta a estímulos específicos, como infecções por *Vibrio alginolyticus*, destaca a complexidade e a especificidade da resposta imune de *Loripes orbiculatus* em diferentes contextos fisiológicos e ambientais. No pé desse bivalve foi identificado um peptídeo I α -NK-Lysin-like com expressão diferencial significativamente aumentada. Nas brânquias, vários PAMs também apresentaram expressão diferencial, sendo ASABF-related peptide, o mais sobreexpresso neste órgão. Esses exemplos de PAMs expressos diferentemente em tecidos específicos de *Loripes orbiculatus* demonstram a complexidade da regulação da expressão desses peptídeos antimicrobianos (Llanos-Lizcano, 2024).

Além dessa resposta imune mediada por PAMs, outro mecanismo é o sistema profenoloxidase (ProPO), que inclui uma variedade de enzimas, é ativado não apenas pelos hemócitos, mas também pela presença de proteases externas e LPS bacteriano. Isso resulta na ativação da cascata de melanina, que ajuda a controlar infecções bacterianas ao reduzir a disseminação do patógeno e o tamanho da área afetada. Além disso, alguns componentes do sistema ProPO podem promover a opsonização, facilitando a ação fagocítica dos hemócitos, enquanto outros possuem propriedades semelhantes às citotóxicas (Sousa et al, 2019).

Por fim, pouco ainda se conhece a respeito do sistema imune de moluscos da família Lucinidae, apesar da sua grande importância ecológica e potencial econômico, inclusive para o setor da aquicultura nacional e do estado de Santa Catarina. Neste sentido, o presente estudo poderá fornecer uma compreensão básica de alguns mecanismos de defesa do molusco lucínídeo *P. pectinatus* contra patógenos, bem como acerca do impacto de

enfermidades bacterianas sobre o tecido branquial, responsável por abrigar os endosimbiontes quimiossintetizantes.

OBJETIVOS

1.5 Geral

Realizar uma caracterização inicial dos parâmetros hemato-imunológicos e da histomorfologia dos filamentos branquiais do molusco lucinídeo *Phacoides pectinatus*, bem como avaliar o impacto da infecção por *Vibrio parahaemolyticus* sobre a resposta hemato-imunológica e a histomorfologia dos filamentos branquiais desta espécie de molusco.

1.6 Específicos

- Padronizar as estruturas e condições necessárias para a manutenção de *P. pectinatus* em condições de laboratório;
- Padronizar as técnicas e realizar uma caracterização inicial dos parâmetros celulares e humorais básicos de *P. pectinatus*;
- Desenvolver e padronizar um protocolo para extração e isolamento das bactérias simbióticas presentes no tecido branquial de *P. pectinatus*.
- Padronizar as técnicas e realizar uma caracterização inicial da histomorfologia dos filamentos branquiais de *P. pectinatus*.
- Avaliar a mortalidade, parâmetros hemato-imunológicos e a histomorfologia da brânquia de *P. pectinatus* frente à infecção com diferentes concentrações da cepa patogênica de *V. parahaemolyticus* via *intramuscular* (adutor);

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padronização de estruturas para manutenção de *P. pectinatus* em laboratório

Para determinar as condições ótimas para o manejo em laboratório da espécie *P. pectinatus*, foram investigados três ambientes diferentes, a saber: 1) apenas com água salobra clara; 2) com água salobra clara, uma camada de areia e uma camada fina de lodo e 3) com água salobra clara, uma camada de areia e uma camada espessa de lodo. A salinidade foi mantida constante em 20 ppt (2%) e a temperatura foi mantida entre 23-25°C em todos os ambientes. Os tanques possuíam volume de 60L, cada tanque teve 10 animais, sendo dois tanques por tratamento.

O primeiro ambiente consistiu em água clara, sem a adição de substratos como areia ou lodo, visando avaliar a viabilidade de manutenção a curto prazo com foco na facilidade de manipulação.

No segundo ambiente, foi adicionada uma camada basal de areia (± 2 cm), e acima de lodo do mangue, com espessura entre 8-10 cm. Em seguida, o tanque foi preenchido com água salobra (40 L). Para aeração, foram colocadas duas mangueiras acopladas a pedras porosas em cada extremo do tanque, no meio da coluna de água. Este ambiente foi projetado para proporcionar condições propícias para a manutenção da espécie em médio a longo prazo, pois o lodo forneceria os compostos sulfurosos para os processos quimiossintéticos realizados pelos endossimbiontes, proporcionando assim, a devida nutrição e manutenção do holossimbionte (hospedeiro + endossimbiontes).

O terceiro ambiente também utilizou uma camada de areia e uma espessura maior de lodo, variando entre 3-4 cm e 20-23 cm, respectivamente, sendo então preenchido com água salobra (± 20 L). Para aeração, foram colocadas duas mangueiras acopladas a pedras porosas na camada basal de areia por dentro de canos, também em ambos os extremos do tanque. O objetivo deste ambiente, além dos acima descritos para o segundo ambiente, foi verificar se o estímulo ao comportamento fossorial (adaptação para cavar e viver em tocas subterrâneas) resultaria em maior conforto animal.

Em todos os ambientes, a salinidade e a temperatura foram monitoradas e mantidas constantes para garantir condições uniformes durante os experimentos. A comparação entre os diferentes ambientes visou identificar as condições mais adequadas para a manutenção

da espécie a médio e longo prazo para os estudos e ensaios subsequentes, levando em consideração a estabilidade das condições ambientais, a mortalidade e a facilidade de manejo.

2.2 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada do músculo adutor anterior de seis animais de cada ambiente, aparentemente saudáveis, da espécie *P. pectinatus*, utilizando-se de uma agulha (23G) acoplada a uma seringa estéril (3 mL) resfriada a 0°C. Para a contagem total e diferencial de hemócitos (THC, do inglês *Total Hemocyte Count*, e DHC, do inglês *Differential Hemocyte Count*, respectivamente), a hemolinfa foi imediatamente transferida para uma solução antiagregante MAS (do inglês *modified Alsever's anticoagulant solution*, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, 115 mM glicose, 336 mM NaCl, pH 7,2) acrescido de formol 4%, na proporção 1:1 (hemolinfa:MAS/formol).

Para a realização dos parâmetros humorais, a hemolinfa coletada dos mesmos animais, utilizando-se das seringas resfriadas a 0°C e sem a presença de solução antiagregante, foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, e então congeladas e descongeladas três vezes para ruptura dos hemócitos, e consequente liberação do conteúdo celular. Por fim, as amostras, agora denominadas de hemolinfa total (HT), foram armazenadas a -20°C para uso posterior.

2.3 Contagem total de células (THC)

Para a THC, alíquotas (10 µL) de hemolinfa fixadas de cada amostra foram pipetadas para câmara de Neubauer, e foi realizada a contagem com auxílio de microscópio óptico de luz (Olympus cx31) e contador manual de células, em triplicata.

2.4 Contagem diferencial de células (DHC)

Para a DHC, alíquotas (50 µL) de hemolinfa fixada foram centrifugadas e ressuspendidas em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) na concentração final de 20 mM para adesão celular. As extensões de hemócitos foram realizadas sobre lâminas estéreis,

incubadas por 15 min, e coradas com solução de Giemsa por 10 min. Em seguida, foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,2) e deixadas secar à temperatura ambiente. Após secas, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico de luz (Olympus cx31) sendo contadas randomicamente 100 células por lâmina, em triplicata.

2.5 Atividade aglutinante

As amostras de HT (50 μ l) foram diluídas serialmente em tampão Tris (TBS-1: 50 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, pH 7,4) em microplacas de 96 poços com fundo em U, e incubadas com o mesmo volume de suspensão de leveduras, *Sacharomyces cerevisiae*, a 2% em TBS-1 (m:v), as quais foram previamente autoclavadas (121°C e 1,1-1,5 $kgf\ cm^{-2}$ por 15min) por 12 h a 4°C em uma câmara úmida. Como controle negativo, a HT foi substituída por TBS-1. O título de aglutinação foi expresso como o recíproco da maior diluição que ainda mostrou aglutinação positiva. O título foi convertido para \log_2 (Maggioni et al., 2004). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade PO da HT de *P. pectinatus* foi determinada espectrofotometricamente (490 nm) através da formação de um pigmento vermelho (DOPACHromo) pela oxidação do substrato da enzima L-DOPA. Para a determinação da atividade total da PO, 50 μ L de HT foram previamente incubadas com igual volume de tripsina (SIGMA, 1 mg mL^{-1}) por 5 min sob temperatura ambiente em uma microplaca de 96 poços, e então adicionado 50 μ L de L-DOPA (SIGMA, 3 mg mL^{-1}). Para a atividade basal, a solução de tripsina foi substituída por TBS-2 (50 mM Tris, 5 mM, $MgCl_2$, 10 mM de $CaCl_2$, 336 mM NaCl, pH 7,4). Nos controles negativos, a HT foi substituída por TBS-2. A formação de DOPA-cromo foi medida após 10, 20, 30 e 40 min, utilizando leitor de microplacas (Mindray 96A). A atividade da PO específica foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância $min^{-1}\ mg^{-1}$ de proteína e a atividade da PO absoluta foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância $min^{-1}\ mL^{-1}$.

2.7 Concentração proteica

O conteúdo de proteína da HT foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

2.8 Processamento histológico

Após a coleta de hemolinfa, foram inoculados com uma seringa 3 ml de solução fixadora de Davidson na massa visceral dos seis animais e, em seguida, estes foram removidos inteiramente das conchas e acondicionados em recipientes contendo solução de Davidson salino, nos quais permaneceram por 24h para completa fixação. Posteriormente, os ctenídeos foram retirados, clivados, processados e embebidos em parafina, seguindo protocolo convencional de histologia. Após serem emblocados, realizou-se cortes transversais de 3 µm de espessura, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) seguindo os protocolos padrões das referidas colorações.

2.9 Infecção bacteriana experimental

2.9.1 Inóculo bacteriano

A cepa utilizada no desafio foi *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. Primeiramente, ela foi cultivada em meio líquido BHI (infusão de cérebro e coração) por 24h a 35°C. Após o período de crescimento, a cultura foi centrifugada (1.000×g por 15 min) e suspensa em PBS-salina (136,5g de Fosfato monobásico, 5000g de NaCl e 473,5g de Fosfato dibásico). A concentração bacteriana foi então ajustada para $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^8$ UFC (Unidade Formadora de Colônias) mL⁻¹, com base no protocolo de diluição e contagem em placa padronizado previamente para referida cepa.

Animais

Foram utilizados 60 indivíduos saudáveis e adultos da espécie *P. pectinatus*, (49,5±1,5 mm de altura, obtidos no litoral do Paraná, região sul do Brasil, na cidade de Paranaguá

(25°31'12"S e 48°30'32"W). Os moluscos foram transferidos para o Laboratório de Aquicultura do Instituto Federal Catarinense campus Araquari (LAq/IFC-Araquari), onde foram acondicionados em seis tanques de 60 L, sendo 10 animais em cada. As condições de cultivo utilizadas foram conforme descrito no item 3.1 para o terceiro ambiente. Os animais ficaram 10 dias em aclimação nos tanques sob estas condições, previamente a infecção experimental, sem alimentação.

2.9.2 *Desafio experimental*

Os seis tanques foram randomicamente divididos em três tratamentos, sendo eles: controle (sem infecção), tratamento $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e tratamento $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Cada tratamento dispôs dois tanques, contendo 10 animais por tanque. Para o desafio, os animais foram inoculados com 100 µL animal⁻¹ da suspensão bacteriana de *V. parahaemolyticus* no músculo adutor anterior utilizando uma agulha (23G) acoplada a uma seringa estéril (3 mL), segundo protocolo adaptado de Duperthuy e colaboradores (2010), nas concentrações de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ UFC animal⁻¹, conforme o tratamento. Os animais do grupo controle foram inoculados com o mesmo volume de solução salina estéril (NaCl 2%). A mortalidade foi monitorada a cada 6 h desafio durante os sete dias de desafio.

2.9.3 *Coleta de amostras e análises*

Foram realizadas coletas de amostras após 24 h (1 dia) e 120 h (5 dias) do início da infecção, sendo utilizados dois animais por tanque para cada coleta. Durante as coletas foram amostrados: hemolinfa para a realização das análises hemato-imunológicas, e brânquias para análises histológicas, seguindo as metodologias descritas nos itens 3.2 e 3.8, respectivamente.

Foram realizados os seguintes parâmetros: THC, DHC, atividade aglutinante, atividade da PO, concentração proteica e atividade antibacteriana. Os seis primeiros parâmetros foram realizados conforme as metodologias descritas nos itens 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7, respectivamente.

A atividade antibacteriana foi realizada frente à bactéria *Vibrio parahemolyticus*

através do método de difusão em Ágar (CLSI, 2015). Inicialmente, foi preparada uma suspensão bacteriana, de acordo com o padrão da escala de Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Posteriormente, as bactérias foram semeadas em placas de Petri (Ágar Müller Hinton), em seguida, discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com HT (10 µL) e depositados sobre o meio de cultura. Como controle positivo foi utilizado disco contendo os antibióticos florfenicol e oxitetraciclina. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 h. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média aritmética dos mm de diâmetro do halo de inibição formado ao redor dos discos.

Foram realizadas análises histológicas dos animais de cada tratamento seguindo a metodologia descrita nos item 3.8.

2.10 Desenvolvimento de protocolo para isolamento das bactérias endossimbiontes

2.10.1 Isolamento das bactérias endossimbiontes com meio de cultura não seletivo

Para o isolamento de bactérias endossimbióticas do molusco *P. pectinatus*, foram utilizados meios de cultura não seletivos com várias condições experimentais. Os meios de cultura testados incluíam variações de concentração de sacarose (2%, 10%, 15% e 20%), tiosulfato (5% e 10%), tipos de água (destilada e salobra estuarina estéril) e a presença ou ausência de amostras de brânquias estéreis (2%) como aditivo. Para o isolamento de bactérias foram utilizados animais do ensaio anterior de padronização de estruturas em laboratório.

Em seguida, foi realizada a extração e preparação das brânquias. Inicialmente, as brânquias do molusco foram extraídas e pesadas, totalizando aproximadamente 6 gramas. Em seguida, as brânquias foram submetidas a um procedimento de lavagem para garantir a esterilização e a remoção de possíveis contaminantes externos.

Para a lavagem, as brânquias foram submetidas a quatro processos. O primeiro processo foi a lavagem: as brânquias foram submersas em solução salina estéril por 30 segundos. Após a lavagem inicial, as brânquias foram imersas em álcool a 70% por um intervalo de 30 a 60 segundos. Posteriormente, as brânquias foram novamente lavadas com solução salina estéril por 60 segundos e finalmente uma última lavagem com solução salina estéril.

Em seguida, as brânquias esterilizadas foram submetidas ao processo de maceramento. Este envolveu a combinação das brânquias com solução salina estéril na proporção 1:1 para liberar as bactérias endossimbióticas presentes em seu interior.

As suspensões resultantes do maceramento foram então plaqueadas em meios de cultura preparados previamente. As placas foram incubadas a 26 °C por um período de 48-72 horas.

2.10.2 Isolamento das bactérias endossimbiontes associando ao protocolo de enriquecimento bacteriano com a utilização de meio de cultura seletivo para cepas marinhas

Para a incubação e enriquecimento endossimbionte as brânquias foram incubadas por 75 minutos a temperatura ambiente em 50 µL de Meio de Incubação IBS (Soro bovino fetal 10-20%, hemina, 0,05 g/L; hidroxiquinolina, 0,002 g/L; ácido ascórbico, 0,001 g/L; sulfato ferroso, 0,02 g/L; glicose, 1 g/L; peptona, 10 g/L. Após a incubação, as brânquias foram transferidas para um novo tubo de 1,5 mL contendo apenas IBS e homogeneizadas utilizando um moedor Eppendorf. A suspensão homogeneizada foi centrifugada a 30 g por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, evitando a transferência de qualquer sedimento, e centrifugado a 400 g por 2 minutos para sedimentar as bactérias endossimbiontes. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano ressuspendido em 1 mL de IBS.

Por fim, a incubação foi testada no meio de cultura Marine Broth (2216 -Millipore), sendo sua composição: nitrato de amônio, 1.6 mg/L; ácido bórico, 22.0 mg/L; cloreto de cálcio, 1.8 g/L; fosfato dissódico, 8.0 mg/L; citrato férrico, 0.1 g/L; cloreto de magnésio, 5.9 g/L; sulfato de magnésio, 3.24 g/L; peptona, 5.0 g/L; brometo de potássio, 0.08 g/L; cloreto de potássio, 0.55 g/L; bicarbonato de sódio, 0.16 g/L; cloreto de sódio, 19.45 g/L; fluoreto de sódio, 2.4 mg/L; silicato de sódio, 4.0 mg/L; cloreto de estrôncio, 34.0 mg/L; extrato de levedura, 1.0 g/L). As placas foram incubadas a 35°C por um período de 24h.

Para a análise de taxonomia molecular, o DNA genômico das cepas foi isolado e submetido à amplificação da sequência do gene 16S rRNA utilizando a técnica de PCR. Foram empregados os primers *forward* 16SrRNA27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e *reverse* 16SrRNARC1492 (5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), conforme os protocolos

comerciais estabelecidos pela Neoprosecta. Os produtos resultantes da PCR foram purificados e sequenciados pela Neoprosecta. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com outras sequências disponíveis no banco de dados do Gene Bank, utilizando o software BLAST[®] do NCBI.

2.11 Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA 13. Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de homocidasticidade e normalidade, Levena e Shapiro-Wilk, em seguida, a análise de variância (ANOVA) fatorial para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos experimentais, nos dois tempos de coleta. Quando a ANOVA indicou significância, as comparações múltiplas entre as médias foram realizadas utilizando o teste de Tukey, a fim de identificar quais grupos apresentavam diferenças significativas entre si. Os dados de sobrevivência avaliados pelo teste Kaplan-Meier. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Padronização de estruturas para manutenção de *P. pectinatus* em laboratório

Foram investigados três ambientes para determinação das condições ótimas para manutenção de *P. pectinatus* em laboratório. A primeira condição, utilizando água salobra clara com salinidade de 20 ppt (2%) e temperatura entre 23-25°C, apresentou uma viabilidade adequada a curto prazo, entre semanas a 1-2 meses, com facilidade de manipulação. No entanto, observou-se uma maior mortalidade a longo prazo. A segunda condição, com água salobra, adição de areia e uma camada de 10 cm de lodo, mantendo a salinidade de 20 ppt (2%) e temperatura entre 23-25°C, demonstrou ser um ambiente propício para manutenção em médio a longo prazo, viável por meses, alcançando uma manutenção estável e de fácil manejo ao longo do tempo. Já a terceira condição, que utilizava água salobra, areia e uma camada mais espessa de lodo, variando entre 20-25 cm, também manteve a salinidade e temperatura constantes. Embora essa condição proporcionou a manutenção dos animais em médio a longo prazo, exigiu um manejo mais complexo e trabalhoso. Concluiu-se que a condição com água salobra, areia e uma camada de 10 cm de lodo foi a mais eficaz, proporcionando um ambiente estável e de fácil manejo para a manutenção de *P. pectinatus* em laboratório.

3.2 Desafio experimental

Os dados de mortalidade dos animais neste experimento indicaram que a dose letal (50%) da cepa patogênica de *V. parahaemolyticus* foi determinada na concentração de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. O tratamento com a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ apresentou taxa de 100% de mortalidade após sete dias de infecção, indicando a influência da concentração bacteriana na mortalidade dos animais, conforme apresentado na figura 3.

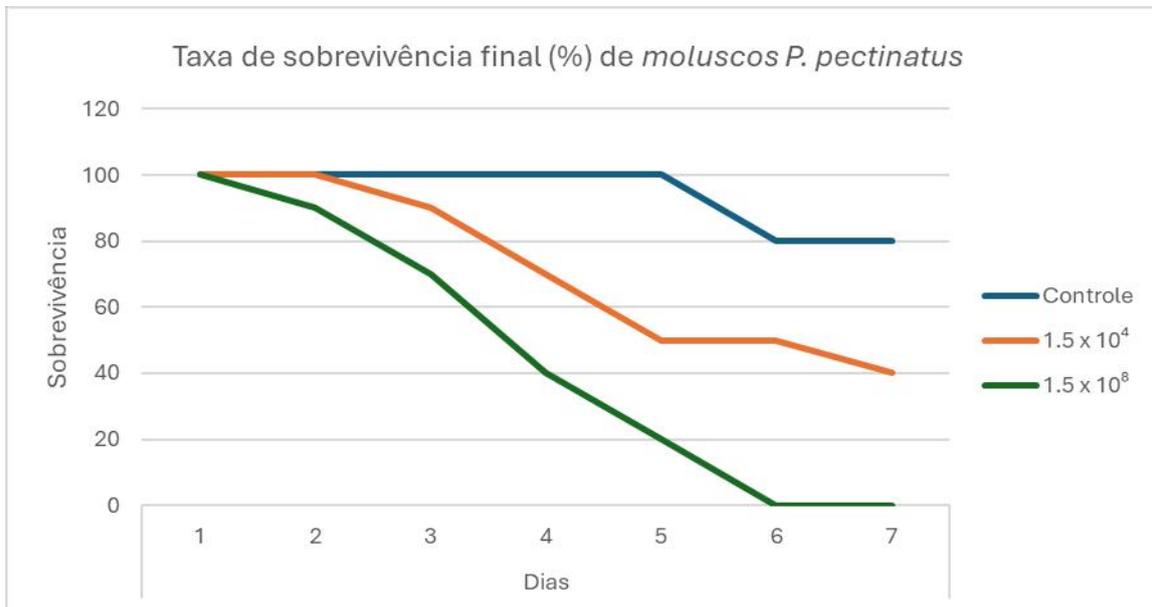


Figura 3) Taxa de sobrevivência final (%) de moluscos *P. pectinatus* após a infecção com *V. parahaemolyticus*.
Fonte: Autor próprio (2024).

3.3 Parâmetros hemato-imunológicos

3.3.1 Contagem total e diferencial de hemócitos

A contagem total de hemócitos dos animais coletados diretamente do ambiente, variou entre $1,0$ e $2,0 \times 10^6$ células mL^{-1} . Após extensa padronização do protocolo de coloração foram identificados dois tipos distintos: os hialinos e os granulares, as contagens diferenciais para granulares variam de 79,0% a 86,0%, e para hialinas variam de 14,0% a 21,0%, respectivamente. A contagem total e diferencial de hemócitos proporcionou uma referência para a análise dos resultados obtidos das medições de carga bacteriana em diferentes tratamentos, um e cinco dias após a infecção. Em ambos os tempos de coleta não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1).

3.3.2 *Concentração proteica*

A concentração proteica diminuiu com a infecção bacteriana, sendo menor numericamente no grupo infectado com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Tabela 1).

3.3.3 *Atividade da fenoloxidade (PO)*

Os valores de atividade da PO, tanto absoluta quanto específica, apresentaram grande variação. Os grupos infectados demonstraram uma clara tendência de incremento em ambas as atividades, no entanto, as atividades da PO foram significativamente maiores apenas no grupo com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ no quinto dia de infecção (Tabela 1).

3.3.4 *Título Aglutinante*

O título aglutinante foi reduzido significativamente nos dois tratamentos com doses infectantes. Um dia após a infecção, o grupo controle apresentou um título aglutinante de $8,0 \pm 1,7$, enquanto os grupos desafiados com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ apresentaram títulos aglutinantes de $5,0 \pm 1,7$, ambos significativamente menores que o controle. Cinco dias após a infecção, o grupo controle apresentou um título aglutinante de $9,5 \pm 0,7$, em comparação com os títulos de $5,0 \pm 1,0$ nos grupos desafiados com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Tabela 1).

3.3.5 *Atividade antimicrobiana*

Em relação a atividade antimicrobiana, embora tenha sido observada uma tendência de redução da atividade antimicrobiana nos animais infectados, não detectada diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle em ambos os tempos de coleta (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros hemato-imunológicos de *P. pectinatus* após 24h e 120h de desafio com *V. parahaemolyticus*, nas concentrações 1.5×10^4 e 1.5×10^8 UFC mL⁻¹, tendo como controle animais inoculados com solução salina estéril.

Tratamentos	THC	Concentração	PO absoluta	PO específica	Título	Atividade
	($\times 10^6$ células mL ⁻¹)	proteica (mg mL ⁻¹)	(U min ⁻¹ mL ⁻¹)	(U min ⁻¹ mg proteína ⁻¹)	aglutinante (log ²)	antimicrobiana (mm)
	1 dia após a infecção					
Controle	1,4 ± 0,3	4,9 ± 0,4 ^{aA}	13.72 ± 3.6 ^{aA}	2.85 ± 0.60 ^{aA}	8.0 ± 1.7 ^{aA}	2.3 ± 1.5 ^a
1.5 x10 ⁴ UFC mL ⁻¹	1,5 ± 0,3	3,3 ± 2,8 ^{aA}	23.89 ± 17.80 ^{aA}	10.33 ± 5.51 ^{aA}	5.0 ± 1.7 ^{abA}	1.3 ± 0.6 ^a
1.5 x10 ⁸ UFC mL ⁻¹	1,9 ± 0,6	4,5 ± 2,2 ^{aA}	27.58 ± 12.61 ^{aA}	8.07 ± 7.2 ^{aA}	5.0 ± 1.7 ^{abA}	1.0 ± 1.4 ^a
	5 dias após a infecção					
Controle	1,8 ± 0,3	3.9 ± 1,6 ^{aB}	26.00 ± 12.18 ^{aA}	7.96 ± 5.75 ^{aA}	9.5 ± 0.7 ^{aA}	2.0 ± 1.0 ^a
1.5 x10 ⁴ UFC mL ⁻¹	1,9 ± 0,5	1.8 ± 1,7 ^{aB}	48.52 ± 16.62 ^{aA}	17.56 ± 0.39 ^{aA}	5.0 ± 1.0 ^{ba}	1.2 ± 0.3 ^a
1.5 x10 ⁸ UFC mL ⁻¹	1,2 ± 0,3	2,0 ± 1,2 ^{aB}	202.56 ± 132.12 ^{bb}	104.66 ± 11.68 ^{bb}	5.0 ± 1.0 ^{ba}	1.0 ± 1.0 ^a

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Estatísticas: ANOVA fatorial -Tukey

Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo de coleta ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas em cada tratamento entre diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$)

3.4 Análise histomorfológicas das brânquias

3.4.1 Controles: descrição da morfologia normal da demibrânquia

As características histológicas observadas nas brânquias dos animais analisados foram semelhantes às descritas por Frenkiel (1996). O ctenídeo está conformado por uma única demibrânquia composta por uma lamela externa e uma interna, cada uma composta por múltiplos filamentos de formato tubular e epitélio simples, dispostos transversalmente ao eixo da lamela. As células deste epitélio são de dois tipos: células mucosas de citoplasma amplo e claro e núcleos pequenos, centrais e arredondados, e células de grânulo marrom, de citoplasmas eosinofílicos ou claros com um grânulo grande, arredondado e marrom amarelado, e núcleos médios, arredondados e basais.

Cada filamento possui dois prolongamentos digitiformes, um em cada extremo, tendo o extremo frontal uma borda ciliada que varia de comprimento ao longo da lamela, sendo mais curta nos filamentos dos extremos e mais longa nos da porção medial. Já as prolongações digitiformes do extremo abfrontal são todas longas. As lamelas possuem conexões a cada 7 a 15 filamentos chamadas de septos, compostas por uma matriz de tecido conectivo, filamentos quitinosos e vasos hemolinfáticos chamados de lacunas sanguíneas. Estes vasos são vistos também nos espaços interfilamentosos (Figura 4).

4.4.2 Tratamento: 1.5×10^4 UFC mL⁻¹

Após 24h de desafio com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ de *V. parahaemolyticus*, foi observada hiperplasia das células mucosas apenas nos filamentos das zonas abfrontais em proporção inferior ao 60%, com inclinação do seu eixo longitudinal de aproximadamente 90 graus em direção à prolongação digitiforme adjacente, outorgando à esta zona aparência de “alisamento”. Adicionalmente foi observado colabamento de aproximadamente 25% do espaço interlamelar pelo contato estreito entre as superfícies “alisadas” das duas lamelas. Foram observados múltiplos focos de congestão nas lacunas hemolinfáticas dos espaços interfilamentosos (Figura 5.A).

Após 120h de desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de *V. parahaemolyticus*, a hiperplasia das células mucosas dos prolongamentos digitiformes abfrontais dos filamentos diminuiu para aproximadamente 40%, porém foi observada de forma ocasional nas zonas frontais. O alisamento e aderências destes prolongamentos diminuíram proporcionalmente e o colapamento do espaço interlamelar diminuiu para aproximadamente 10%. Os focos de congestão nas lacunas hemolinfáticas e septos foram observados raramente (Figura 5.B).

4.4.3 Tratamento: $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹

Após 24 h de desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de *V. parahaemolyticus*, foi observado em, aproximadamente, 80% dos prolongamentos digitiformes dos filamentos das zonas abfrontais, hiperplasia de células mucosas. Alisamento e aderência foram observados de forma frequente nestas zonas, com 30 a 40% de colapso do espaço interlamelar. Nas aderências entre as células mucosas, foram observados densos filamentos de tecido conectivo fibroso denso. Focos de congestão nas lacunas hemolinfáticas foram vistos eventualmente nos espaços interfilamentosos e raramente nos septos (figura 5.C).

Após 120h de desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de *V. parahaemolyticus*, a hiperplasia das células mucosas foi observada em mais de 80% das zonas abfrontais e de 40 a 50% das zonas frontais. As zonas abfrontais com hiperplasia de células mucosas apresentaram alisamento generalizado das bordas, além de aderência generalizada e colapamento de aproximadamente 50% do espaço interlamelar. Nas aderências entre as células mucosas, foram observados densos filamentos de tecido conectivo fibroso. Contudo, infiltrados de células inflamatórias hemolinfáticas propriamente ditos não foram observados, apenas focos de congestão nas lacunas hemolinfáticas dos espaços interfilamentosos (Figura 5.D).

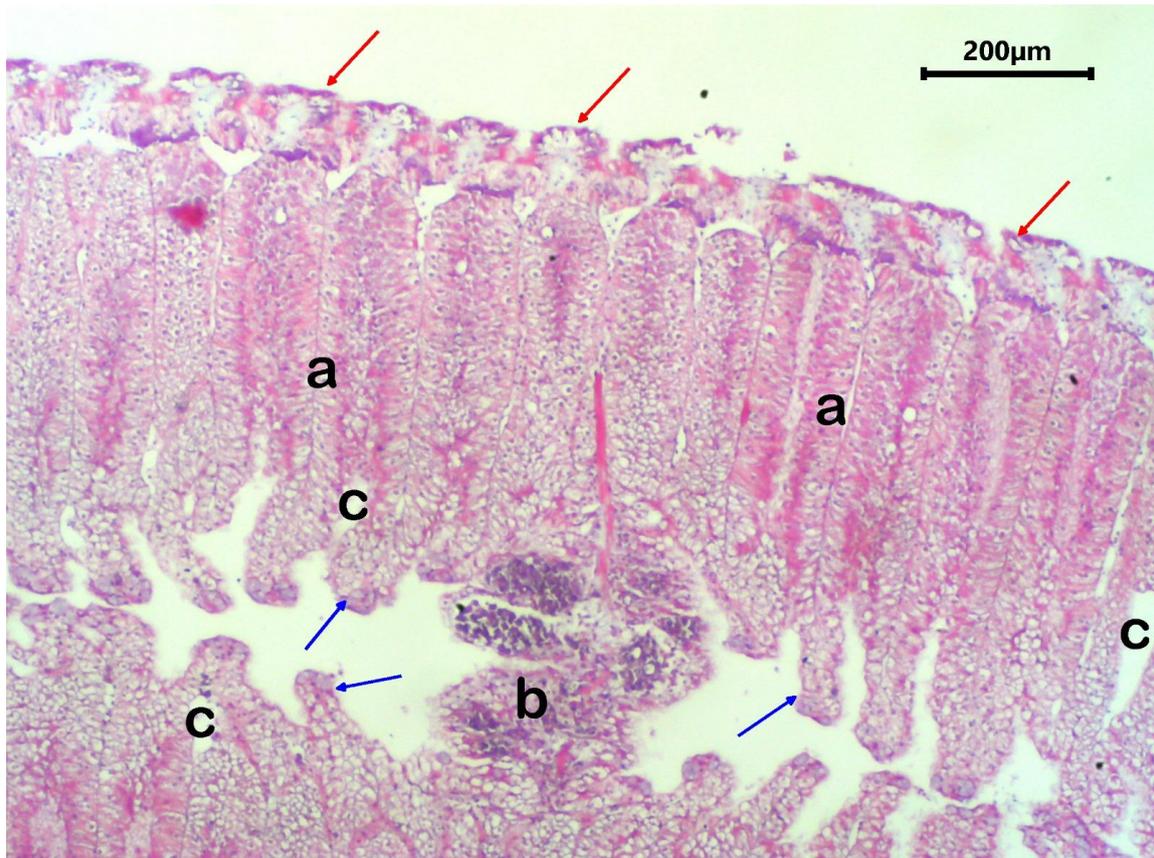


Figura 4) Corte transversal de demibrânquia normal de *P. pectinatus*, aumento 400X. (a) filamentos lamelares o (b) células hemolinfáticas, (c) a diferença da lacuna sanguínea do espaço interfilamentoso. Adicionalmente é possível observar os prolongamentos digitiformes filamentosos frontais (seta vermelha) e abfrontais (seta azul) septo (seta preta).

Fonte: Autor próprio (2024).

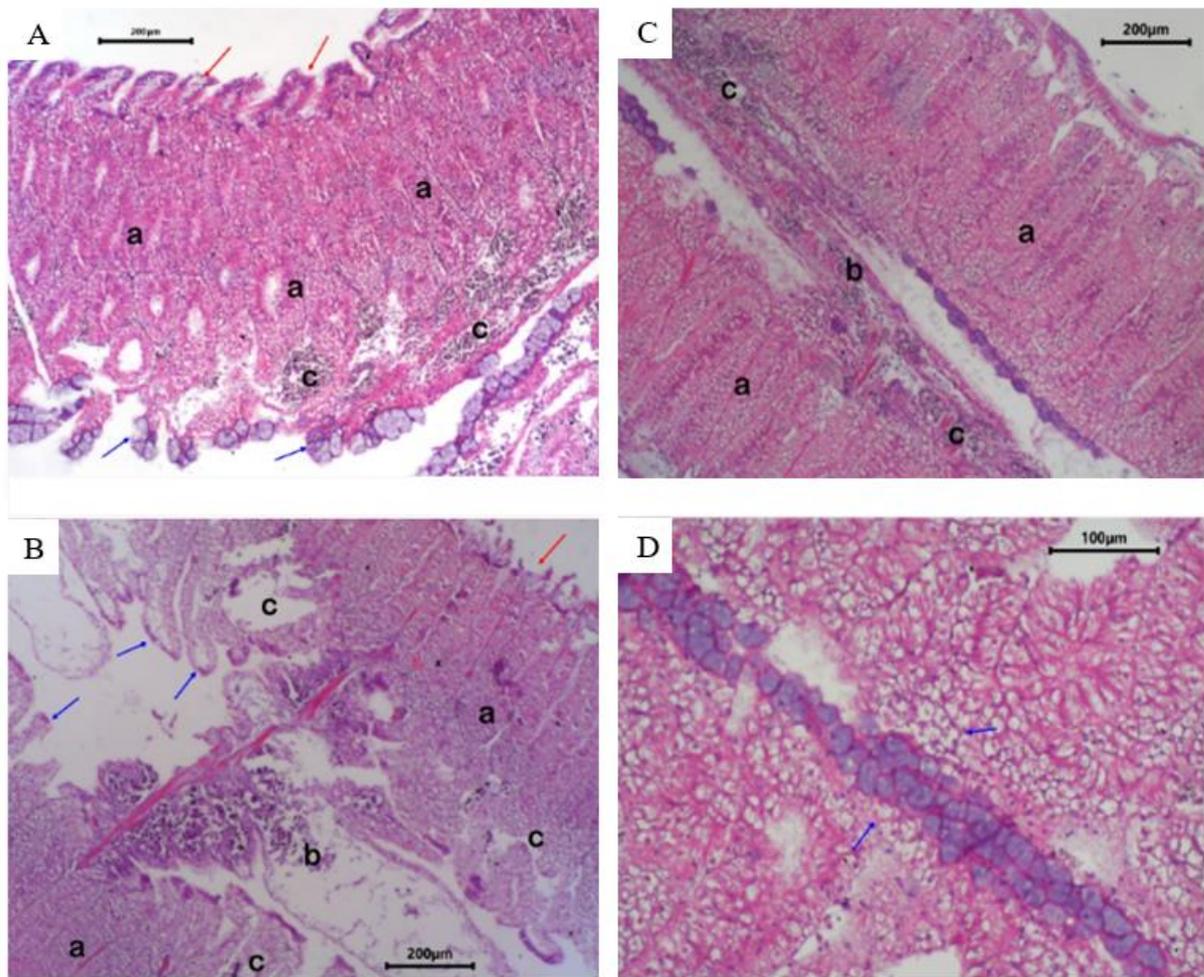


Figura 5) Alterações nas demibrânquias de *P. pectinatus* após desafios com *V. parahaemolyticus*. a=filamento lamelar; b=lacuna hemolinfática; c=septo; seta azul = prolongamento digitiforme filiforme abfrontal; seta vermelha = prolongamento digitiforme filamentar frontal. A) 24 horas após desafio com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹: intensa hiperplasia de células mucosas nos prolongamentos digitiformes abfrontais com alisamento da borda e congestão celular intensa nas lacunas hemolinfáticas; B) 120 horas após desafio com $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹:a hiperplasia de células mucosas diminui nos prolongamentos digitiformes abfrontais, voltando estes à sua configuração normal, mas a congestão celular nas lacunas hemolinfáticas permanece; C) 24 horas após desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹: extensa hiperplasia de células mucosas nos prolongamentos digitiformes abfrontais com alisamento da borda e congestão celular intensa nas lacunas hemolinfáticas; D) 120 horas após desafio com $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹: Note-se a extensa hiperplasia de células mucosas e alisamento dos prolongamentos digitiformes abfrontais, com forte aderência entre as bordas abfrontais e total colapso do espaço interlamelar. As bordas lamelares parecem estar unidas por uma camada de tecido conectivo denso.

Fonte: Autor próprio (2024)

Tabela 2 - Histopatologia: alterações nas brânquias após 24h e 120h de desafio com *V. parahaemolyticus*, nas concentrações 1.5×10^4 e 1.5×10^8 UFC mL⁻¹, tendo como controle animais inoculados com solução salina estéril.

Tratamentos	Aderências	Fibroses	Hiperplasia celular	Infiltrado celular	Necroses
Controle - 24h	0	0	0	0	0
Controle - 120h	0	0	0	0	0
1.5×10^4 UFC mL ⁻¹ – 24h	0	0	2	2	0
1.5×10^4 UFC mL ⁻¹ – 120h	1	0	1	1	0
1.5×10^8 UFC mL ⁻¹ – 24h	2	2	2	2	1
1.5×10^8 UFC mL ⁻¹ – 120h	2	1	2	0	1

0 para ausência de lesão, 1 para lesões que comprometem até 25% do órgão, 2 para comprometimento de até 50%, e 3 para alterações que afetam mais de 50% do órgão. Metodologia seguida conforme Guia de Histopatologia para Peixes de Água Doce de Martins (2018).

Fonte: Autor próprio (2024).

3.5 Isolamento das bactérias endossimbiontes com meio de cultura não seletivo

As condições e meios empregados levaram ao crescimento de diferentes colônias, as quais foram submetidas a um processo de isolamento por estriamento e confirmação por coloração de Gram. Ao fim, foram isoladas cinco morfotipos diferentes com base na forma, textura e coloração da colônia, juntamente com o formato e coloração das células bacterianas por meio da coloração de Gram. Após o sequenciamento do gene 16s rRNA e alinhamento das sequências destes isolados com a base de dados do NCBI (Blast), foi possível identificar os cinco isolados a nível de espécie. No entanto, nenhum dos isolados se tratava da cepa endossimbiótica, *Sedimenticola endophacoides* (Tabela 3).

Tabela 3 - Identificação das bactérias isoladas em meio de cultura não seletivo (isolados 1 a 5) e seletivo (isolados 6 e 7).

Isolado	Bactéria	Similaridade
1	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99%
2	<i>Shewanella baltica</i>	99%
3	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99%
4	<i>Shewanella baltica</i>	99%
5	<i>Shewanella aquamarina</i>	80%
6	<i>Francisella philomiragia</i>	99%
7	<i>Shewanella algae</i>	99%

Fonte: Autor próprio (2024).

Durante o processo de isolamento de bactérias endossimbiontes, foi utilizado um protocolo de enriquecimento bacteriano em conjunto com meio de cultura seletivo para cepas marinhas. Isso permitiu o crescimento de diversas colônias, que foram subsequentemente submetidas a um processo de isolamento por estriamento e confirmação através da coloração de Gram. Ao final deste processo, foram isolados dois morfotipos distintos, baseados em características como forma, textura e coloração das colônias, bem como formato e coloração das células bacterianas evidenciadas pela coloração de Gram. O sequenciamento do gene 16s rRNA e o alinhamento das sequências obtidas com a base de dados do NCBI (Blast) possibilitaram a identificação dos três isolados em nível de espécie. No entanto, nenhum dos isolados correspondia à cepa endossimbiótica *Sedimenticola*

endophacoides (Tabela 3).

3.6 Discussão

O presente estudo limitou-se a uma caracterização inicial acerca da resposta imune de *Phacoides pectinatus* frente à infecção bacteriana, assim como seu impacto causado sobre a histomorfologia da brânquia, órgão que, dentre outras funções, abriga bactérias simbiotes quimiossintetizantes, uma característica comum entre os integrantes da família Lucinidae. Nesta pesquisa, observou-se que esta espécie exibe variações na resposta imunológica quando exposta a diferentes concentrações da bactéria patogênica *V. parahaemolyticus*. Inicialmente, a dose letal da bactéria (50%) foi determinada em uma concentração de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Ao final do desafio experimental, verificou-se que concentrações mais elevadas ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) resultaram em 100% de mortalidade, evidenciando o potencial patogênico de *V. parahaemolyticus* para esta espécie de molusco lucinídeo.

Na avaliação dos parâmetros imunes de *P. pectinatus*, embora não tenha sido observada diferença significativa na contagem total de hemócitos após a infecção com *V. parahaemolyticus*, houve uma tendência de aumento na contagem total nos grupos infectados após 24h, e de diminuição no tratamento com maior dose após 120h de infecção. Similarmnte, Vieira (2016) realizando uma infecção experimental com *Vibrio alginolyticus* no bivalve *Pteria hirundo* por 7 dias, observou que a contagem de hemócitos caiu pela metade após 24 horas de infecção. O autor do referido estudo sugeriu que esta diminuição se deu pela migração massiva dos hemócitos através dos tecidos para os sítios de infecção, gerando diferentes respostas imunológicas.

Por outro lado, Allam e Raftos (2015) compilaram diferentes estudos e apontaram que o aumento na contagem de hemócitos após infecção é uma resposta comum em bivalves, e essencial no combate de agentes patogênicos. Bouallegui (2019) também mencionou que a contagem total de hemócitos pode variar dependendo do tipo de infecção e da resposta imune do organismo, podendo tanto aumentar como diminuir.

A ausência de mudança significativa tanto na contagem total quanto diferencial de hemócitos no presente estudo pode ter sido uma consequência da grande variação observada, em especial nos grupos infectados, e/ou um indicativo de que *P. pectinatus* quando infectado pela bactéria *V. parahaemolyticus* apresenta uma resposta imune celular e

humoral diferencial, priorizando alguns mecanismos humorais em detrimento de mecanismos celulares. Cabe destacar que, a capacidade do organismo de manter o equilíbrio homeostático, mesmo em face de desafios infecciosos, pode explicar a estabilidade na contagem de hemócitos (Bouallegui, 2019)

Por outro lado, observou-se que a atividade da fenoloxidase (PO), absoluta e específica, aumentaram com a infecção, sendo significativamente maior apenas no grupo com 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ no quinto dia de infecção. Esses achados sugerem uma resposta diferencial da PO possivelmente influenciada pela infecção. A PO é uma enzima chave na resposta efetora contra patógenos, ativando a cascata de melanização. A atividade da PO resulta na oxidação de compostos fenólicos em quinonas e posteriormente em melanina e seus derivados, os quais possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas e antivirais. Estudos anteriores demonstraram uma correlação negativa entre os níveis de atividade da PO e a infecção por certos patógenos. Assim, programas de melhoramento genético selecionaram ostras com atividade aumentada da PO para aumentar a resistência a patógenos específicos (Cedric et al., 2015).

Esses resultados estão alinhados com as observações de Cedric (2015), no estudo realizado com a amêijo-manila (*Venerupis philippinarum*), os bivalves foram infectados com *Vibrio tapetis*. A atividade das enzimas fenoloxidase (PO) foi monitorada ao longo de 30 dias após a infecção. Observou-se um aumento significativo na atividade da fenoloxidase (PO) entre 7 e 14 dias após, indicando uma resposta imunológica dos bivalves frente à infecção. Tal achado, corrobora aos do presente trabalho.

O título aglutinante reduziu significativamente em ambos os tratamentos infectantes. A infecção pode causar uma regulação negativa dos genes que codificam as lectinas, resultando em menor produção dessas proteínas (Söderhall et al., 2022). Além disso, *V. parahemolyticus* pode secretar produtos que inibem diretamente a atividade aglutinante das lectinas ou produzir enzimas que degradam essas proteínas, diminuindo sua funcionalidade.

No estudo, a análise histológica dos filamentos branquiais de *P. pectinatus* revelou uma hiperplasia de células mucosas. Essa condição levou ao alisamento generalizado das bordas e à aderência das lamelas, resultando no desaparecimento do espaço interlamelar em uma significativa porção das demibrânquias. Além disso, as aderências entre as células mucosas apresentaram densos filamentos de tecido conectivo fibroso. Focos extensos de

necrose foram observados nos eixos das zonas ciliares e intermediárias, com necroses discretas eventuais nas zonas laterais, próximas das zonas abfrontais (Figura X).

De forma semelhante, o estudo de Laith (201) analisou as alterações histopatológicas em mexilhões, *Perna viridis*, após serem desafiados com a bactéria *V. alginolyticus*, e observou uma série de alterações significativas nos tecidos, incluindo hiperplasia das células mucosas em várias zonas das brânquias, alisamento das bordas das lamelas e aderência entre estas, levando ao colapso do espaço interlamelar. Adicionalmente, foi observado neste estudo severa fibrose nos septos interlamelares e, em alguns casos, nos espaços interfilamentosos. Focos de necrose foram detectados principalmente nas zonas ciliares e intermediárias. Congestão nas lacunas hemolinfáticas foi frequente, mas não se observou infiltração inflamatória significativa. Observações estas que estão alinhadas as observadas no presente trabalho.

Os resultados das alterações histopatológicas em *P. viridis* apresentam semelhanças substanciais com os encontrados no presente trabalho com *P. pectinatus*. Em ambos os estudos, a hiperplasia das células mucosas foi uma resposta predominante, sendo que, no presente estudo, a hiperplasia foi observada em 80% dos filamentos das zonas abfrontais após 24 horas de tratamento. Ambas as pesquisas relataram alisamento das bordas das lamelas e aderência significativa entre elas, resultando em colapso parcial ou total do espaço interlamelar, bem como a presença de fibrose nos septos interlamelares e espaços interfilamentosos, e congestão nas lacunas hemolinfáticas. No entanto no presente estudo a presença de infiltrados inflamatórios não tenham sido proeminentes.

Por outro lado, o estudo de Yue (2010) avaliou resultados histológicos de mariscos-da-concha-dura, *Meretrix meretrix* infectados pela bactéria *V. parahaemolyticus* e observou granulações heterogêneas de alta densidade eletrônica nos tecidos conjuntivos, indicando a presença de grandes vesículas e grânulos resultantes da fusão de vesículas menores. Nestes animais, relatou-se também alterações estruturais nas brânquias, como secreção excessiva no epitélio das amêijoas. Nos grupos infectados de *P. pectinatus* no presente estudo, foi observado o alisamento das bordas das lamelas com aderência. Outro ponto em comum de ambos os estudos foi a fibrose observada nos septos interlamelares das brânquias em ambos os casos.

As lesões histológicas observadas nos estudos são respostas a infecção bacteriana, que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que recrutam células

imunológicas ao local da infecção, ocasionando alterações teciduais decorrentes (Thompson et al, 2004). Além disso, a secreção excessiva de mucina observada nas brânquias e a deposição de grânulos no manto, observados por Yue (2010) e no presente estudo, podem ser indicativo de uma resposta de mucosa típica contra a colonização bacteriana, a qual visa aumentar a barreira física e química contra os patógenos (Stackebrandt et al., 2002; Le Roux et al., 2004).

Em *P. pectinatus*, uma possível hipótese para explicar tais observações é que a presença do *V. parahaemolyticus* desencadeou uma resposta imunológica de mucosa robusta, levando à ativação de células efectoras e à produção aumentada de mucina nas brânquias. Essas respostas podem ter sido uma tentativa adaptativa de conter a disseminação bacteriana e mitigar os danos aos tecidos, semelhante ao observado em outros estudos de patogenia bacteriana em outros moluscos (Söderhall et al., 2022).

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que *P. pectinatus* é suscetível à infecção por *V. parahaemolyticus*, com as doses $1,5 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, ocasionando 50% e 100% de mortalidade. A infecção acarretou mudanças substanciais na histomorfologia do tecido branquial, bem como em alguns parâmetros hemato-imunológicos, particularmente os humorais, desta espécie de molusco lucinídeo.

Adicionalmente, este estudo identificou que um ambiente com água salobra (20 ppt), utilização de areia e uma camada com 10 cm de profundidade de lodo do mangue como substratos, e manutenção da temperatura entre 23-25°C proporciona um ambiente estável e de fácil manejo para a espécie *P. pectinatus* em condição de laboratório.

Por fim, os protocolos desenvolvidos e avaliados ao longo do estudo para o isolamento da bactéria endossimbiótica não demonstraram resultados positivos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Futuros estudos visando o desenvolvimento de protocolos de isolamento dos endossimbiontes, bem como a compreensão mais aprofundada da resposta imune de *P. pectinatus* se fazem necessários, haja vista o grande potencial desta espécie como modelo biológico para estudos acerca da interação do sistema imune inato com microrganismos benéficos e patogênicos, aliado à sua relevância para culinária regional e, consequentemente potencial aquícola.

REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Bioquímica e Fisiologia Comparativa Parte A: Fisiologia Molecular e Integrativa*, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.
- ALLAM, B.; ESPINOSA, E. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Frontiers in Immunology*, v. 7, p. 1-26, 2016.
- ALLAM, B.; RAFTOS, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 131, p. 121–136, out. 2015.
- BOUALLEGUI, Y. Immunity in mussels: An overview of molecular components and mechanisms with a focus on the functional defenses. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 89, p. 158–169, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.057>.
- BRYANT, R. N.; RICHARDSON, J. A.; KALIA, T. C.; GROS, O.; LOPEZ-GARRIGA, J.; BLÄTTLER, C. L. Inorganic sulfate-based signatures of chemosymbiosis in modern infaunal lucinids. *Geology*, v. 51, n. 11, p. 1022–1026, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1130/G51353.1>.
- BULGAKOV, A. A.; PARK, K.-I.; CHOI, K.-S.; LIM, H.-K.; CHO, M. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 16, p. 487-499, 2004.
- CANESI, L.; AUGUSTE, M.; BALBI, T.; PROCHAZKOVA, P. Soluble mediators of innate immunity in annelids and bivalve mollusks: A mini-review. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022. DOI: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1051155>.
- LE BRIS, C.; RICHARD, G.; PAILLARD, C.; LAMBERT, C.; SEGUINEAU, C.; GAUTHIER, O.; PERNET, F.; GUERARD, F. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 42, n. 1, p. 16-24, janeiro de 2015.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase system in invertebrates. *Immunological Reviews*, v. 198, p. 72-82, 2004.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Variable immune molecules in invertebrates. *Immunological Reviews*, v. 4, p. 4313–4319, 2013.
- CHAPMAN, A. D. *Numbers of Living Species in Australia and the World*. 2. ed. Canberra: Australian Biological Resources Study, 2009.

CHENG, T. C. Bivalves. In: RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. (Eds.). *Invertebrate Blood Cells*. London, UK: Academic Press, 1981. p. 233–300.

DUBILIER, N.; BERGIN, C.; LOTT, C. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 725–740, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1992>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1992#citeas>. Acesso em: 18 set. 2022.

DONAGHY, L.; VOLETY, A. K. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 31, n. 6, p. 808–814, 2011.

DUPRAT, M. F. L. B. **Impactos da promoção de alimentos tradicionais como produto turístico gastronômico**: estudo da cadeia produtiva da matéria-prima. 2020. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. DOI: 10.11606/T.5.2020.tde-25062021-113226. Acesso em: 2024-07-06.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations: Global Aquaculture Production 1950-2019*. 2021a. Disponível em: https://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTRY. Acesso em: 01 dez. 2021.

FAO. *Food Outlook. Biannual Report on Global Food Markets*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Roma, Itália, 2021b. 180p. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4479en/>. Acesso em: 01 dez. 2021.

FISHER, W. S. Structure and Functions of Oyster Hemocytes. In: BREHÉLIN, M. (Ed.). *Immunity in Invertebrates*. Berlin, Germany: Springer, 1986. p. 25–35. DOI: 10.1007/978-3-642-70768-1.

FRELIE, P. E.; SIS, R. F.; BELL, T. A.; LEWIS, D. H. Microscopic and ultra structural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus nannamei*) culture in Texas. *Veterinary Pathology*, v. 29, p. 269–277, 2002.

GOSLING, E. *Marine Bivalve Molluscs*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Inc, 2015. p. 524.

GOSLING, E. *Moluscos Bivalves. Biologia, Ecologia e Cultura*. Oxford, Reino Unido: Publicação de Livros de Notícias sobre Pesca, 2003. p. 443.

IBGE. *Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 01 dez. 2021.

INFOAGRO/SC. *Sistema Integrado de Informações Agropecuárias da Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca de Santa Catarina. Info. Agro, Santa Catarina*, 2022. Disponível em: <https://infoagro.sc.gov.br/index.php/safra/producao-animal-2>. Acesso em: 01 dez. 2021.

JOHNSON, T. *Bivalve aquaculture: A review of shellfish production and culture methods*. **Shellfish Culture Review**, 2020. Disponível em: <https://www.shellfishculture.org/resources/bivalve-aquaculture-review>. Acesso em: 01 dez. 2021.

KONSTANTINOOU, I. K.; HALLOY, S. The impact of pharmaceuticals on marine invertebrates and implications for ecosystems and human health. *Marine Pollution Bulletin*, v. 154, p. 111074, 2020.

LAUNAY, S.; BETAÏL, G. Évaluation de la situation du secteur des mollusques bivalves en Europe et de ses perspectives d'avenir. *Rapport technique*, 2022. Disponível em: <https://www.mollusque-europe.org/evaluation-secteur/>. Acesso em: 01 dez. 2021.

Lechaire JP, Frébourg G, Gaill F, Gros O. In situ localization of sulphur in the thioautotrophic symbiotic model *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) by cryo-EFTEM microanalysis. *Biol Cell*. 2006 Mar;98(3):163-70. doi: 10.1042/BC20040502. PMID: 15892692.

LOKER, E. S.; ADEMA, C. M.; ZHANG, S. M.; KEPLER, T. B. Sistemas imunológicos de invertebrados - não homogêneos, nem simples, nem bem compreendidos. *Immunological Reviews*, v. 198, p. 10–24, 2004. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x.

MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, v. 191, p. 23-44, 2000.

MILLER, A. C. *Bivalve Health: An In-Depth Guide to Maintaining and Cultivating Healthy Shellfish*. 3. ed. San Diego: Shellfish Press, 2018. 320p.

MINAMIKAWA, M.; HINE, M.; RUSSEL, S.; HUBER, P.; DUIGNAN, P.; LUMSDEN, J. S. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 17, p. 463-476, 2004.

NEWELL, R. I. E. Ecosystem Influences of Natural and Cultivated Populations of Suspension-Feeding Bivalve Molluscs: A Review. *Journal of Shellfish Research*, v. 23, p. 51–61, 2004.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia de Invertebrados: Uma Abordagem Evolutiva Funcional. *Systematic Biology*, v. 53, p. 662–664, 2004. DOI: 10.1080/10635150490472977.

SHEEHAN, D.; MCDONAGH, B. Estresse oxidativo e bivalves: uma abordagem proteômica. *Invertebrate Survival Journal*, v. 5, p. 110–123, 2008.

SOUSA, H.; HINZMANN, M. Review: Antibacterial components of the Bivalve's immune system and the potential of freshwater bivalves as a source of new antibacterial compounds. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 98, p. 971-980, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.10.062. PMID: 31676427.

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

SUZUKI, T.; MORI, K. Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: A possible non-self recognition system. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 14, p. 161-173, 1990.

VAUGHN, C. C.; HOELLEIN, T. J. Impactos dos bivalves nos ecossistemas de água doce e marinhos. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. [200?].

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. *In*: MAEDA-MARTÍNEZ, A. N. (Ed.). **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura**. México: Universidad Autónoma de Baja California, 2004. p. 325-346.