



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito *in vitro* de cianobactérias nas respostas de defesa da ostra *Crassostrea gasar*

Lucas Nunes Santana

Orientadora: Prof^ª Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

Coorientador: MSc. Fernando Ramos Queiroga

João Pessoa – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito *in vitro* de cianobactérias nas respostas de defesa da ostra *Crassostrea gasar*

Lucas Nunes Santana

Orientadora: Prof^a. Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

Coorientador: MSc. Fernando Ramos Queiroga

Trabalho - Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

João Pessoa – 2016

S232e Santana, Lucas Nunes.
Efeito *in vitro* de cianobactérias nas respostas de defesa da ostra *Crassostrea gasar* / Lucas Nunes Santana.- João Pessoa, 2016.
41f. : il.
Orientadora: Patricia Mirella da Silva Scardua
Coorientador: Fernando Ramos Queiroga
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN
1. Ciências biológicas. 2. Cianobactérias marinhas.
3. *Synechocystis*. 4. Ostras. 5. *Crassostrea gasar*.

UFPB/BC

CDU: 57/59(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lucas Nunes Santana

Efeito in vitro de cianobactérias nas respostas de defesa da ostra Crassostrea gasar

Trabalho – Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua - Orientadora

UFPB/ Centro de Ciências Exatas e da Natureza/ Departamento de Biologia Molecular

Dra. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos - Avaliadora

Universidade Estadual da Paraíba

Hélène Hégaret - Avaliadora

Centro Nacional de Pesquisa Científica, França

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua, por ter me recebido em seu laboratório desde o começo de minha graduação. Por toda a paciência, atenção e carinho que recebi durante todo esse tempo. Sua orientação foi extremamente importante para mim e serei eternamente grato. Com a sua ajuda aprendi uma imensidão de coisas e descobri meu amor pela ciência.

Agradeço também aos professores Dra. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos, Dra. Hélène Hégaret e Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, por terem aceitado serem membros da minha banca examinadora. Agradeço especialmente a Hélène, que veio de tão longe e aceitou ceder um pouco de seu tempo para participar da banca durante sua visita ao Brasil. Agradeço também por ter me recebido com tanto carinho como estagiário em seu laboratório na França durante minha graduação sanduíche, me ajudando a enriquecer meu conhecimento científico. *Merci beaucoup!*

Agradeço ao MSc Fernando Ramos Queiroga (em breve doutor) por ter sido meu coorientador, e, acima de tudo, um amigo. Agradeço pela enorme paciência em me ensinar e por estar sempre me estimulando a pensar.

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados (LABIPI), os que já saíram e os que continuam, pela companhia, pelos momentos de descontração, pelas risadas e conversas nas pausas para o café e, é claro, pela ajuda nos experimentos e pelas discussões científicas.

Aos meus amigos e colegas do LABID pelo tempo que dividimos o espaço e pela companhia.

Ao PIBIC/CNPq pelo apoio financeiro e ao professor Dr. Isac Almeida de Medeiros por disponibilizar o citômetro de fluxo.

Agradeço aos meus pais pelo amor, pela compreensão e pelo apoio durante toda a minha vida. Vocês tem um papel fundamental na minha formação como pessoa e como estudante.

E, por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos e todas as pessoas que passaram por minha vida e que contribuíram, direta ou indiretamente, com coisas boas que me fizeram ser o que sou hoje.

RESUMO

O cultivo de bivalves tem uma importância crescente a nível mundial. No Brasil, a produção aquícola vem apresentando significativas taxas de crescimento. O Nordeste tem grande potencial para a produção das espécies nativas de ostras, *Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae*, pois o seu litoral apresenta amplos estuários, com águas calmas. Paralelamente, a ocorrência de florações de microalgas e cianobactérias nocivas vem aumentando mundialmente, contaminando ambientes marinhos. Espécies produtoras de toxinas podem causar patologias e/ou mortalidades em organismos diversos. Estudos mostraram modificações das respostas fisiológicas e o impacto no sistema imune de bivalves por ocasião das microalgas nocivas, mas muito pouco se conhece sobre os efeitos das cianobactérias marinhas. O principal objetivo desse estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de cianobactérias do gênero *Synechocystis* nas células de defesa da ostra *C. gasar*. Quatro isolados de cianobactérias obtidos do litoral da Paraíba (M3C, M60C, M62C e M129C) foram utilizados neste estudo. Inicialmente, a proliferação dos isolados foi avaliada em cultivo em meio Conway, na salinidade de 20, durante 26 dias, através da quantificação da concentração celular e da intensidade de fluorescência da clorofila por citometria de fluxo. Ostras adultas foram coletadas no estuário do Rio Mamanguape, Paraíba. Posteriormente, a hemolinfa das ostras foi extraída do músculo adutor (N = 5 grupos de 5 animais) e exposta *in vitro* às cianobactérias inteiras, ou seja, ao cultivo integral (CI), assim como, aos seus produtos extracelulares (PEs), ou seja, cultivo livre de células. Após 3 horas de exposição, à 20 °C, os hemócitos foram analisados por citometria de fluxo quanto à viabilidade celular, à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à capacidade de fagocitose de 3 partículas (látex, zymosan e *Perkinsus marinus*). As cianobactérias apresentaram uma proliferação constante até o último dia, enquanto que a clorofila aumentou a partir do 9º dia. A partir do 14º dia houve o surgimento de restos celulares, provavelmente associados com o declínio do cultivo, apesar de ainda haver uma proliferação celular. A exposição dos hemócitos às CIs de todas as cianobactérias, exceto o M60C, levou a uma redução significativa da viabilidade. Nenhuma cianobactéria ou seus PEs promoveram uma modificação significativa na produção de ROS. Somente a fagocitose de partículas de látex foi alterada, havendo uma redução em resposta à CI de M62C ($5,1 \pm 0,3\%$) e a todos os PEs (média de $5,3 \pm 0,1\%$). Em conclusão, as cianobactérias testadas possuem compostos capazes de alterar a viabilidade de hemócitos de ostras *C. gasar* e sua capacidade de fagocitar algumas partículas inertes, parecendo interferir no combate da ostra a infecções.

Palavras-chave: Cianobactérias marinhas; *Synechocystis*, ostras; *Crassostrea gasar*, hemócitos.

ABSTRACT

The shellfish farming has a growing importance worldwide. In Brazil, aquaculture production has shown significant growth rates. The Northeast Brazil has great potential for the production of native species of oysters, *Crassostrea gasar* and *C. rhizophorae*, as its coast offers large estuaries with calm waters. In parallel, the occurrence of harmful algal and cyanobacteria blooms is increasing worldwide, contaminating marine environments. Toxin-producing species can cause disease and/or mortality in several organisms. Studies have shown changes in physiological responses and an impact on the immune system of bivalves during harmful algal blooms, but very little is known about the effects of marine cyanobacteria. The main objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of cyanobacteria of the *Synechocystis* genus in oysters *C. gasar* defense cells. Four cyanobacteria isolates obtained from the coast of Paraíba (M3C, M60C, M62C e M129C) were used in this study. Firstly, the growth of the cyanobacteria isolates was evaluated in the culture medium Conway, 20 of salinity, for 26 days by quantifying the cell concentration and fluorescence intensity of chlorophyll by flow cytometry. Secondly, adult oysters were collected in the estuary of the Mamanguape River, Paraíba. The hemolymph of oysters was extracted from the adductor muscle (n = 5 groups of 5 animals) and exposed *in vitro* to entire cyanobacteria, i.e, the whole culture (IC), as well to its extracellular products (PE), i.e. cell-free culture. After 3 hours of exposure, at 20 °C, hemocytes were analyzed by flow cytometry for cell viability, production of reactive oxygen species (ROS) and phagocytosis capacity of 3 particles (latex, zymosan and *Perkinsus marinus*). Cyanobacteria showed continuous growth until the last day, while chlorophyll increased from the 9th. After the 14th day cellular debris appeared, probably associated with the decline of the culture, although there was still cell proliferation. The exposure of the hemocytes to all cyanobacteria ICs, except the M60C, led to a significant reduction in viability. No cyanobacteria or their PEs promoted a significant change in the ROS production. Only the phagocytosis of latex particles was changed, with a reduction in response to M62C's CI ($5.1 \pm 0.3\%$) and to all PEs (mean $5.3 \pm 0.1\%$). In conclusion, the cyanobacteria studied have compounds capable of altering the oysters *C. gasar* hemocytes viability and their ability to phagocytose some inert particles, seeming to interfere with the oyster fighting against infections.

Keywords: Marine cyanobacteria; *Synechocystis*, oysters; *Crassostrea gasar*, hemocytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de cultivo artesanal de ostras nativas no estuário do Rio Mamanguape, na Paraíba	13
Figura 2. Ambientes impactados com a floração de cianobactérias nocivas	15
Figura 3. Mecanismos de defesa dos hemócitos	17
Figura 4. Curvas de proliferação celular (células/mL) das cianobactérias M3C, M60C, M62C e M129C	25
Figura 5. Curva da fluorescência média da clorofila das cianobactérias M3C, M60C, M62C e M129C	25
Figura 6. Quantidade de restos celulares presentes nos cultivos das cianobactérias M3C, M60C, M62C e M192C	26
Figura 7. Citogramas representativos da cianobactéria M129C, no 21º dia de cultivo	26
Figura 8. Viabilidade de hemócitos da ostra <i>Crassostrea gasar</i> após exposição às culturas integrais de cianobactérias	27
Figura 9. Fagocitose (%) de partículas de látex pelos hemócitos da ostra <i>Crassostrea gasar</i> após exposição às cianobactérias	28

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Efeito de cianobactérias em hemócitos de ostras <i>Crassostrea gasar</i>	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMFE	- Água do mar filtrada estéril
ASP	- <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i> (Toxina amnésica de frutos do mar)
CFSE	- Diacetado de 5-(6)carboxifluoresceína succinimidil-éster
CI	- Cultura Integral
DCFH-DA	- 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DSP	- <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i> (Toxina diarreica de frutos do mar)
FAK/Scr	- <i>Focal Adhesion Kinase/Steroid Receptor Coactivator</i> (Quinase de adesão focal / Coativador do receptor de esteróide)
FITC	- <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FSC	- <i>Forward Scattered</i> (Dispersão Frontal)
HAB	- <i>Harmful Algal Bloom</i> (Floração de algas nocivas)
LARBIM	- Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas
LPS	- Lipopolissacarídeo
MAPK	- <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (Proteína-quinases ativadas por mitógenos)
MARCO	- <i>Macrophage Receptor with Collagenous Structure</i> (Receptor de macrófago com estrutura de colágeno)
NSP	- <i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i> (Toxina neurotóxica de frutos do mar)
PE	- Produto Extracelular
PerCP	- <i>Peridinin chlorophyll</i> (Peridinina-clorofila)
PSP	- <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i> (Toxina paralisante de frutos do mar)
ROS	- <i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
SSC	- <i>Side Scattered</i> (Dispersão Lateral)
UFPB	- Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Produção de moluscos no Brasil	12
1.2. Florações de espécies de microalgas e de cianobactérias nocivas	13
1.3. Sistema imunológico de bivalves	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Obtenção, manutenção e estudo da proliferação <i>in vitro</i> dos isolados de cianobactérias	20
3.2. Efeito <i>in vitro</i> das cianobactérias nos hemócitos da ostra <i>Crassostrea gasar</i>	21
3.2.1. Coleta de ostras e extração de hemolinfa	21
3.2.2. Análises por citometria de fluxo	22
3.2.3. Viabilidade celular	22
3.2.4. Produção de espécies reativas de oxigênio	22
3.2.5. Fagocitose	22
3.3. Análise estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Proliferação <i>in vitro</i> das cianobactérias	24
4.2. Efeito <i>in vitro</i> das cianobactérias nos hemócitos da ostra <i>Crassostrea gasar</i>	27

5. DISCUSSÃO	29
5.1. Proliferação <i>in vitro</i> das cianobactérias	29
5.2. Efeito <i>in vitro</i> das cianobactérias nos hemócitos da ostra <i>Crassostrea gasar</i>	29
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS	34

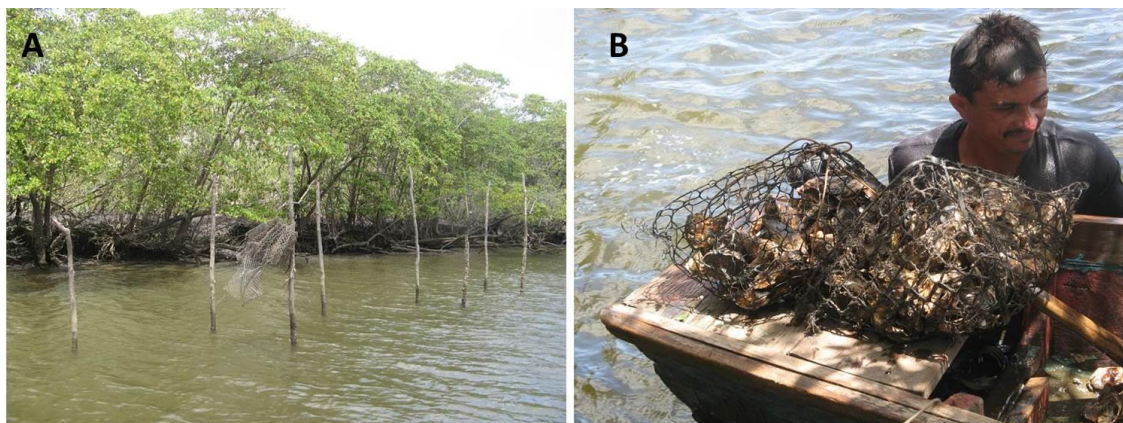
1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção de moluscos no Brasil

O cultivo de moluscos, incluindo os bivalves, tem uma importância crescente a nível mundial, comprovada pelas estatísticas da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, 2016). No Brasil, a produção aquícola, desde seu início como atividade comercial consolidada, nos anos 90, vem apresentando significativas taxas de crescimento (IBGE, 2013). Atualmente, a produção de bivalves envolve algumas espécies, entre elas *Crassostrea gigas*, a ostra japonesa, introduzida no Brasil nos anos 70 e as espécies nativas como *Perna perna* (mexilhão) e *Nodipecten nodosus* (vieira). O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional e tornou-se uma referência nacional pelo êxito da atividade (EPAGRI, 2015). No entanto, grande parte do litoral brasileiro apresenta potencial para o cultivo de moluscos, basta o estabelecimento de uma tecnologia eficiente de produção, adaptada a cada local. O Nordeste tem grande potencial para a produção das espécies nativas de ostras, *C. rhizophorae* e *C. gasar*, pois o seu litoral apresenta amplos estuários, com águas calmas (LAVANDER et al., 2007).

No estado da Paraíba, devido à falta de suporte financeiro, técnico e científico, a produção de ostras ainda é incipiente. Ela se concentra no estuário do Rio Mamanguape, localizado na Área de Proteção Ambiental de Barra de Mamanguape, a 80 quilômetros ao norte da capital da Paraíba, João Pessoa. Apesar de ser um dos mais conservados do estado, este estuário apresenta intensa interferência antrópica, proveniente dos cultivos de cana-de-açúcar e atividade madeireira na região (ROCHA et al. 2008). Neste estuário existem apenas cinco cultivos comerciais de ostras *C. gasar* em pequena escala (**Figura 1**); um dos produtores de maior êxito comercializa sua produção anual (aproximadamente 5 t) integralmente no estado de Pernambuco (comunicação pessoal com o produtor).

Figura 1. Sistema de cultivo artesanal de ostras nativas no estuário do Rio Mamanguape, na Paraíba.



A. Troncos de árvores de mangue fixados no fundo do estuário, onde ficam amarradas bolsas com as ostras em proliferação. **B.** Bolsas contendo as ostras adultas recém-colhidas e prontas para serem comercializadas.

1.2. Florações de espécies de microalgas e de cianobactérias nocivas

A ocorrência de florações de algas nocivas ou HABs (do inglês, *Harmful Algal Blooms*) vem aumentando mundialmente em frequência, intensidade e distribuição geográfica (BACKER et al., 2015). Para explicar este fenômeno, sugerem-se diferentes hipóteses, como por exemplo, as alterações antropogênicas, transferências de moluscos de um local a outro, água de lastro, eutrofização das águas costeiras, temperatura, entre outras (HALLAGRAEFF; HARA, 1995). O efeito tóxico causado pelo consumo de bivalves afetados por florações de algas nocivas, aos consumidores humanos, já é bastante conhecido. Algumas síndromes desencadeadas por diferentes ficotoxinas/espécies-de-algas-nocivas em seres humanos são: toxina paralisante, PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) causada principalmente pelo dinoflagelado *Alexandrium* spp.; toxina amnésica, ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*) causada pela diatomácea *Pseudo-nitzschia* sp.; toxina diarreica, DSP (*Diarrheic Shellfish Poisoning*) causada pelos dinoflagelados *Dinophysis* sp. e *Prorocentrum lima*; toxina neurotóxica, NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*) causada principalmente pelo dinoflagelado *Karenia brevis*. No entanto, as HABs são também responsáveis por desequilíbrios nos ecossistemas marinhos, causando mortalidades em peixes, moluscos e outros organismos aquáticos, vide revisões de Shumway (1990) e Landsberg (2002), portanto, sendo uma ameaça às populações de organismos cultivados.

Vários estudos já demonstraram modificações das respostas fisiológicas de bivalves por ocasião destas florações, vide revisões de Shumway (1990) e Landsberg (2002). Ainda,

recentemente, vários trabalhos vêm mostrando o impacto destas florações no sistema imune de bivalves (HÉGARET; WIKFORS, 2005; HÉGARET et al., 2007a; GALIMANY et al., 2008; HÉGARET et al., 2011).

Por outro lado, as florações de cianobactérias são muito pouco estudadas em ambientes estuarinos e marinhos. A maior parte dos estudos é para ambientes de água doce (CATHERINE et al., 2013). Pouco ainda se conhece sobre o efeito das toxinas por elas produzidas nos bivalves.

As cianobactérias são organismos procariotos, mas inicialmente foram também chamadas de “algas azuis” devido a presença de pigmentos, entre eles a clorofila *a* que lhes confere a capacidade de realizar fotossíntese (MOREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013; RIPPKA et al., 1979). Desse modo, as cianobactérias configuram-se como organismos importantes na produção de O₂, porém, atuam também na fixação de nitrogênio no ambiente aquático (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003). Além disso, as cianobactérias possuem elevada importância econômica, como na produção de alimentos, de produtos farmacológicos e na produção de energia, além do sequestro de carbono (VASCONCELOS et al., 2011).

As cianobactérias, assim como algumas espécies de microalgas eucarióticas, podem se multiplicar em taxas elevadíssimas em resposta à uma grande disponibilidade de nutrientes, caracterizando as chamadas “florações” ou *blooms*, ver revisão de Masó e Garcés (2006) (**Figura 2**). Nestas condições, toxinas produzidas secundariamente ao metabolismo de espécies nocivas, que em cianobactérias são chamadas de cianotoxinas, podem ter sua concentração aumentada no ambiente aquático causando patologias e/ou mortalidades de organismos diversos. O uso da água com esse tipo de contaminação ou consumo de animais expostos à ela, por parte dos seres humanos, pode causar intoxicação e, ocasionalmente, levar a óbito. Tais toxinas tem efeito de bioacumulação, intoxicando animais marinhos e se acumulando ao longo da cadeia trófica.

Com base nos efeitos das cianotoxinas, elas podem ser classificadas em hepatotoxinas, como as microcistinas, nodularinas e cilindropermopsinas; neurotoxinas, como as saxitoxinas, anatoxina-a e homoanatoxina-a; dermatotoxinas, como a lingbiatoxina, citotoxinas e toxinas irritantes (CARMICHAEL; LI, 2006; CARMICHAEL, 1992; MOREIRA; VASCONCELOS; ANTUNES, 2013; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005; CATHERINE et al., 2013).

Alguns estudos utilizaram modelos invertebrados para a compreensão da atividade biológica de cianobactérias nocivas, a saber: em rotíferos (PUSHPARAJ; PELOSI; JÜTTNER, 1998), camarões (GONÇALVES-SOARES et al., 2012; SMITH, 1996), ouriços do mar (MARTINS et al., 2007) e bivalves marinhos, como a ostra perlífera *Pinctada maxima* (NEGRI

et al., 2004) e o mexilhão *Mytilus galoprovincialis* (MARTINS et al., 2007) e de água doce GÉLINAS et al., 2014).

Figura 2. Ambientes impactados com a floração de cianobactérias nocivas



Exemplos de corpos aquáticos com floração de cianobactérias no Canadá (acima esquerda), China (acima direita e abaixo esquerda) e Estados Unidos (abaixo direita). Pela coloração intensa da água, percebe-se a alta proliferação desses organismos, que podem provocar diversos problemas para o ecossistema local (PAERL; PAUL, 2012).

Assim como diversos organismos planctônicos, as cianobactérias são partículas potencialmente filtráveis pelos bivalves (AVILA-POVEDA et al., 2014) e, por isso, podem influenciar sobremaneira sua fisiologia. Desse modo, os estudos da interação bivalve – cianobactéria podem auxiliar na compreensão dos impactos ecológicos e econômicos sobre a fisiologia do animal, que tem uma implicação direta sobre a proliferação, reprodução e, por conseguinte sobre a ecologia populacional. No caso de um bivalve com produção comercial, a implicação será também na produtividade desta espécie.

Gélinas et al. (2014) avaliaram a resposta aos extratos de duas cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* e *Lyngbya wollei* de água doce, sobre os parâmetros imunológicos do mexilhão de água doce *Elliptio complanata*. Foi constatado que ambos os extratos causaram modificações nestes parâmetros, embora por mecanismos distintos, indicando uma resposta específica para cada espécie.

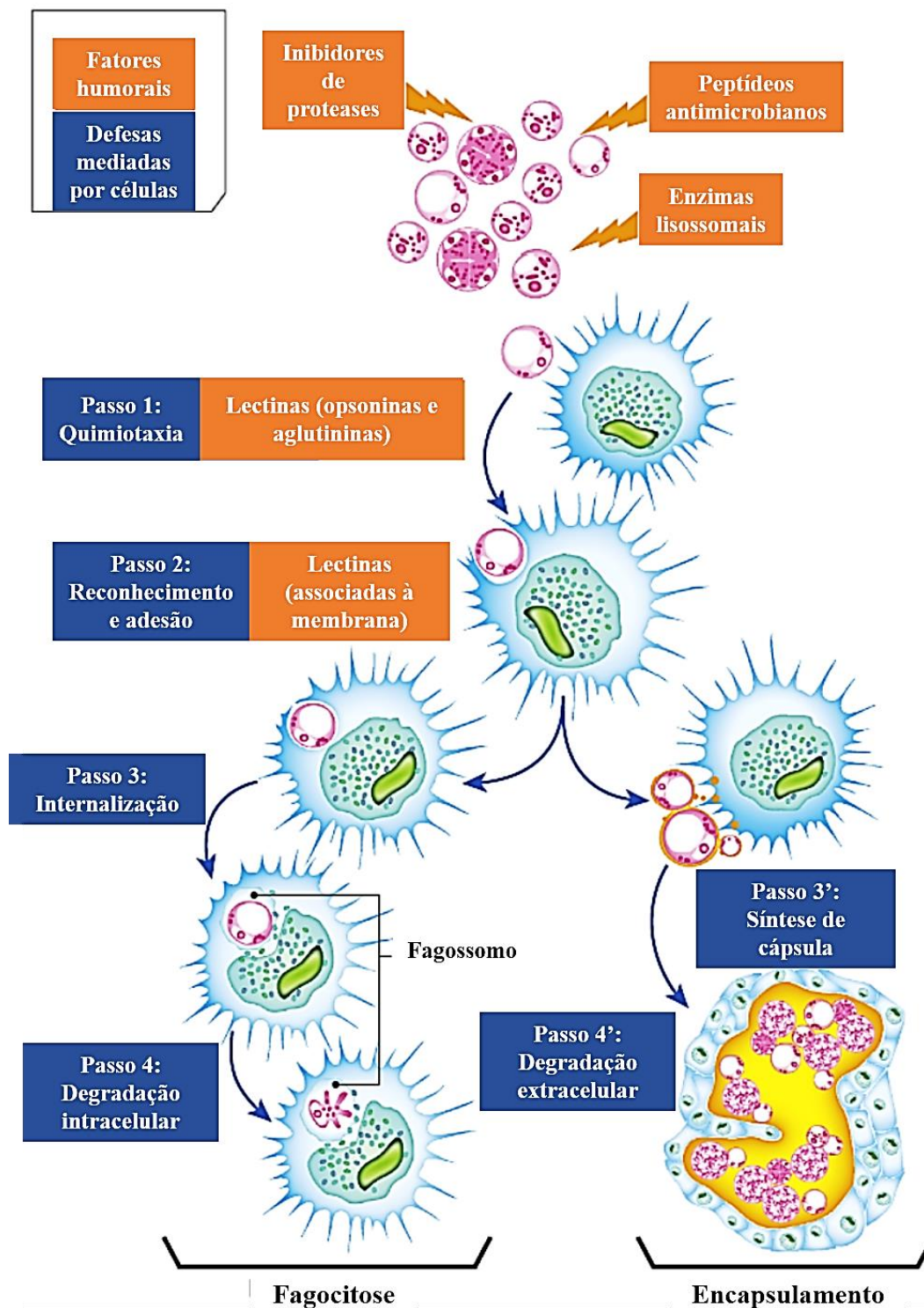
Apesar de existirem pouquíssimos estudos epidemiológicos associados à cianobactérias no litoral do Brasil, especialmente no Nordeste, já se sabe que existem cianobactérias no litoral da Paraíba, tanto em ambientes marinhos quanto estuarinos (comunicação pessoal, Roberto Sassi, LARBIM, UFPB), além de reservatórios de água doce (VASCONCELOS et al., 2011). No entanto, o efeito destas nos bivalves ainda não foram estudados, apesar das altas temperaturas e da elevada taxa de incidência de luz solar dessa região, fatores que propiciam o desenvolvimento de florações, por estimular a reprodução e a fotossíntese das cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1999).

1.3. Sistema imunológico de bivalves

Diferente do que se observa no sistema imunológico de vertebrados, os bivalves, assim como outros invertebrados, apresentam um sistema imune inato ou natural, sem memória imunológica. O sistema imunológico de bivalves está associado à sua hemolinfa (análoga ao sangue de vertebrados), a qual é composta pelo plasma, que é a parte líquida, e pelos hemócitos, as células efetoras da resposta de defesa, vide revisões de Barracco e da Silva (2008) e Song et al. (2010). Em bivalves, existem duas populações básicas de hemócitos: granulares, os quais apresentam grânulos intracitoplasmáticos e hialinos, que apresentam poucos ou nenhum grânulo no citoplasma (CHENG, 1981). Os dois principais mecanismos de defesa celulares são a fagocitose de pequenas partículas e o encapsulamento de parasitas grandes (**Figura 3**).

Os hemócitos são as células circulantes da hemolinfa responsáveis pelas respostas celulares de defesa, atuando nos processos inflamatórios, reparo de feridas, fagocitose de microorganismos e no encapsulamento de agentes patogênicos de grande tamanho. A fagocitose é o principal mecanismo de defesa dos bivalves, sendo um parâmetro imunológico dos mais utilizados para verificar o grau de imunodepressão do animal, assim como, pode ser usada como biomarcador da qualidade ambiental (FOURNIER et al. 2000, DONAGHY et al. 2010). Os hemócitos também são capazes de produzir inúmeras moléculas microbidas, como enzimas hidrolíticas, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e nitrogênio, aglutininas/lectinas e peptídeos antimicrobianos (SONG et al. 2010, SCHMITT et al., 2011).

Figura 3. Mecanismos de defesa dos hemócitos



Os hemócitos podem desencadear respostas dependentes do tamanho celular, fagocitose ou encapsulamento. Em ambos os casos, ocorre quimiotaxia (passo 1), seguido do reconhecimento e adesão à superfície do microrganismo (representado na ilustração pelo protozoário *Perkinsus marinus*) (passo 2). Quando o microrganismo é pequeno, o hemócito internaliza-o (passo 3) e o digere (passo 4). Se o parasito é maior, os hemócitos envolvem-no por camadas e secretam substâncias que impedem sua disseminação (passo 3') e outras que irão destruí-lo extracelularmente (passo 4'). Adaptado de Soudant, Chu e Volety. (2013).

Com o exposto acima, a avaliação das respostas imunológicas de bivalves frente às cianobactérias e suas toxinas é de suma importância para se compreender as interações ecológicas existentes em seu ambiente natural, tendo em vista que esses organismos coabitam o mesmo ecossistema; e os bivalves, por serem filtradores, estão sempre expostos às cianobactérias, presentes em suspensão na água. O presente estudo visa compreender o efeito das cianobactérias na resposta de defesa das ostras e dessa forma também compreender os mecanismos de sobrevivência dos bivalves frente a outros possíveis agentes estressores, como patógenos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* de cianobactérias nas células de defesa (hemócitos) da ostra *Crassostrea gasar*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a proliferação de cianobactérias durante seu cultivo *in vitro*;

2.2.2. Avaliar a sobrevivência dos hemócitos da ostra *C. gasar* após a exposição *in vitro* às cianobactérias e seus produtos extracelulares;

2.2.3. Avaliar a capacidade de fagocitose dos hemócitos da ostra *C. gasar* após a exposição *in vitro* às cianobactérias e seus produtos extracelulares;

2.2.4. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio dos hemócitos da ostra *C. gasar* após a exposição *in vitro* às cianobactérias e seus produtos extracelulares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção, manutenção e estudo da proliferação *in vitro* dos isolados de cianobactérias

Quatro isolados de cianobactérias foram obtidos da coleção do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas (LARBIM), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Eles foram isolados a partir da água do mar de três locais do litoral do Estado da Paraíba: 1) praia do Cabo Branco, João Pessoa (M3C e M60C); 2) praia de Cabedelo (M62C); e, 3) estuário do Rio Mamanguape (M129C). Os isolados M3C, M60C e M62C foram identificados de acordo com suas características morfológicas vistas ao microscópio de luz como sendo *Synechocystis aquatilis*, enquanto que o isolado M129C como sendo *Synechocystis* sp.

Todos os isolados de cianobactérias foram mantidos em meio Conway (WALNE, 1970), a 20 de salinidade e 25 °C.

Primeiramente foi feita uma avaliação da proliferação *in vitro* dos isolados de cianobactérias mediante a determinação da concentração celular e da fluorescência da clorofila. O ensaio foi realizado em Erlenmeyers (em triplicata) em um volume final de 50 mL e teve a duração de 26 dias. O ensaio se iniciou com isolados cultivados por 7 dias, e no dia do início do estudo, sua concentração foi ajustada para 5×10^6 células/mL. A cada 24 horas foram retiradas amostras de 1 mL de cada isolado (em duplicata) que foram fixadas (1:1) em formol a 4% e em seguida mantidas em geladeira.

As amostras foram depositadas em tubos, diluídas em água do mar filtrada estéril (AMFE) quando necessário (1:3 ou 1:4), e em seguida, analisadas em citômetro de fluxo em velocidade baixa (10 μ L/min) durante 30 segundos. Nesta técnica, as células em suspensão são passadas unitariamente e em fluxo contínuo por lasers que irão atravessá-las e sofrer difração, atingindo detectores, como *Forward Scattered* (FSC), que detecta o tamanho celular, recebendo a luz refratada frontalmente, o *Side Scattered* (SSC), que detecta a granulosidade interna celular, recebendo a luz difratada nas laterais e detectores de fluorescência, que serão atingidos por diferentes comprimentos de onda provenientes da excitação de fluoróforos usados para marcar componentes celulares.

Por meio dos detectores FSC e SSC foram obtidos os citogramas de morfologia, ou seja, tamanho em função da granulosidade interna das cianobactérias. A concentração celular foi determinada fazendo uma região na população no citograma FSC vs SSC. A concentração

celular foi estimada considerando a diluição da amostra, a velocidade do citomêtro (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) e o tempo de aquisição dos eventos (30 s).

A emissão de fluorescência da clorofila das cianobactérias foi obtida a partir do detector de fluorescência PerCP (695/40 nm), e este parâmetro foi plotado no citograma em função do tamanho celular (FSC). Uma região foi feita sobre a população celular fluorescente ou na não-fluorescente (restos celulares) para a quantificação das células em cada uma delas.

Para os ensaios *in vitro* do efeito das cianobactérias nos hemócitos da ostra *C. gasar*, os isolados de cianobactérias foram utilizados sempre após 7 dias de cultivo (após um inóculo inicial de 10^6 células/mL. No momento do ensaio, a suspensão de cianobactérias foi diluída em AMFE, na salinidade de 20, na concentração final de 5×10^6 células/mL.

3.2. Efeito *in vitro* das cianobactérias nos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar*

3.2.1. Coleta de ostras e extração de hemolinfa

Ostras *C. gasar* adultas (> 7 cm) foram coletadas em um cultivo do tipo suspenso fixo localizado no estuário do Rio Mamanguape, Estado da Paraíba. A concha das ostras foi parcialmente aberta com a ajuda de um alicate na região posterior e a hemolinfa foi extraída do músculo adutor, utilizando-se uma agulha (21 gauge) acoplada à uma seringa de 1 mL. As amostras foram avaliadas no microscópio quanto à pureza (presença de resíduos ou células não pertencentes à hemolinfa) e mantidas sob gelo para evitar a agregação de hemócitos até o momento da utilização. Em seguida, a hemolinfa foi filtrada em malha de nylon (80 μm) e misturada para a formação de grupos (N = 5) de cinco ostras cada.

Para as seguintes análises, tanto a cultura integral (CI) de células, quanto a cultura livre de células, ou seja, os seus produtos extracelulares (PEs) foram utilizados. As CIs foram preparadas como descrito anteriormente (item 3.1) e os respectivos PEs foram obtidos a partir da filtração de uma amostra da CI em membrana de polietersulfona (0,22 μm), acoplada à uma seringa. O filtrado foi imediatamente utilizado.

Os CIs e PEs das cianobactérias foram individualmente adicionados em tubos de citometria (em duplicata), contendo hemolinfa (N = 5 grupos), na proporção de 1:1. Como controle, a hemolinfa foi misturada (1:1) com Conway diluído em AMFE na mesma proporção da menor diluição obtida com uma das cianobactérias.

Os tubos contendo as suspensões celulares foram mantidos por 3 horas a 20 °C. Em seguida, as suspensões celulares foram preparadas separadamente para análise da viabilidade celular, da produção de espécies reativas de oxigênio e da fagocitose (vide item 3.3).

3.3. Análises por citometria de fluxo

Dois citômetros de fluxo foram utilizados, FACSCalibur e FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Todos os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo (Version X).

3.3.1. Viabilidade celular

A viabilidade dos hemócitos foi avaliada usando o fluoróforo iodeto de propídeo (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA; concentração final de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), um intercalante de DNA dupla fita que é incapaz de transpor a membrana plasmática de células vivas. A porcentagem de hemócitos foi estimada pela análise de células não marcadas (não fluorescentes) no detector FL3 (670 nm). As amostras foram analisadas em fluxo médio por 30 segundos.

3.3.2. Produção de espécies reativas de oxigênio

A sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma Saint Louis, Missouri, EUA; concentração final de 10 μM) foi usada para estimar a produção de ROS. Esta molécula hidrofóbica entra no citoplasma e, subsequentemente, é clivada por esterases intracelulares e transformada em DCFH. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio oxidam o DCFH em DCF, que emite fluorescência (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003; LAMBERT et al. 2003; WARDMAN, 2007). A fluorescência das células foi detectada detector FL1 (530/30 nm). A média geométrica de fluorescência dos hemócitos foi expressa como unidade arbitrária (U.A.). As amostras foram lidas em fluxo médio por 30 segundos.

3.3.3. Fagocitose

Três partículas foram utilizadas para estimar a capacidade de fagocitose dos hemócitos: 1) partícula inerte de látex (Fluoresbrite® Yellow Green Microspheres, 2 μm , Polysciences,

Inc, 18338-5); 2) zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*, 3 μm) covalentemente conjugado com o fluoróforo Texas-Red® (Molecular Probes) e, 3) trofozoítos de *Perkinsus marinus* (média 3,97 $\mu\text{m} \pm 0,26$, isolado CR-PB192), preparado em nosso laboratório. De forma breve, os trofozoítos foram marcados com uma solução de diacetado de 5-(6)carboxifluoresceína succinimidil-éster (CFSE; Biolegend, concentração de 5 μM para 5×10^7 células/mL) de acordo com instruções do fabricante. Esse fluoróforo entra passivamente nas células vivas e tem seus grupos acetatos clivados por esterases intracelulares, convertendo-o em um éster fluorescente. O CFSE apresenta alta estabilidade no interior da célula devido à forte ligação às moléculas intracelulares assegurado por seu grupo succinimidil-éster, o que resulta em um tempo de permanência longo na célula, mesmo após sucessivas divisões celulares. Essas três partículas foram selecionadas pois representam dois grupos de organismos diferentes (fungo e protozoário) e uma molécula sintética que estão em contato com as ostras em seu ambiente natural.

Todas as partículas foram usadas na concentração final de $4 \times 10^7/\text{mL}$, resultando em uma proporção aproximada de 10:1 (partículas : hemócitos). Estas suspensões celulares foram mantidas a 20°C por 1 hora.

As partículas de látex e os trofozoítos de *P. marinus* foram analisados pelo detector FITC (530/30 nm), enquanto o zymosan foi analisado pelo detector Pe-Texas Red® (575/26 nm). As amostras foram analisadas em fluxo médio e foram capturados 10.000 eventos (hemócitos).

A porcentagem de hemócitos fagocíticos foi calculada para cada tratamento. No caso dos trofozoítos, foram considerados apenas os hemócitos granulares, devido ao fato dos trofozoítos apresentarem tamanho e granulosidade interna similar às demais populações de hemócitos.

3.4. Análise estatística

A normalidade e a variância dos dados foi verificada para atender os requisitos para a ANOVA. Os valores em porcentagem sofreram a transformação arco-seno. Para verificar o efeito das cianobactérias nos parâmetros celulares foram realizadas ANOVAs *one-way* (para dados paramétricos) ou testes de Kruskal-Wallis (para dados não paramétricos), seguidos de pós teste LSD. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphics Centurion XVI.II.

4. RESULTADOS

4.1. Proliferação *in vitro* das cianobactérias

A curva de proliferação celular dos quatro isolados de cianobactérias está mostrada na **Figura 4** e a da intensidade média da fluorescência da clorofila na **Figura 5**.

Em todos os cultivos a proliferação celular foi constante até o último dia. No entanto, a partir do 14º dia, todos os cultivos apresentaram um aumento de restos celulares. Estes restos foram detectados no citograma de morfologia (**Figura 6**) pelo surgimento de uma população de menor tamanho, menor granulosidade; assim como no citograma de fluorescência (**Figura 7**). Ainda, foi possível observar a presença de um depósito de material celular no fundo dos Erlenmeyers. A cianobactéria M129C apresentou o maior proliferação celular, enquanto a M3C a menor.

A emissão de fluorescência da clorofila se manteve constante do 1º ao 9º dia de cultivo, aumentando gradualmente até o último dia. As cianobactérias M129C e M62C apresentaram uma maior fluorescência média de clorofila, enquanto a M3C foi a que emitiu a menor fluorescência.

Quando observados a olho nu, os cultivos das cianobactérias M3C e M62C apresentaram coloração marrom a partir do 12º dia de cultivo, enquanto os demais mantiveram uma coloração esverdeada até o último dia do experimento.

Figura 4. Curvas de proliferação celular (células/mL) das cianobactérias M3C, M60C, M62C e M129C.

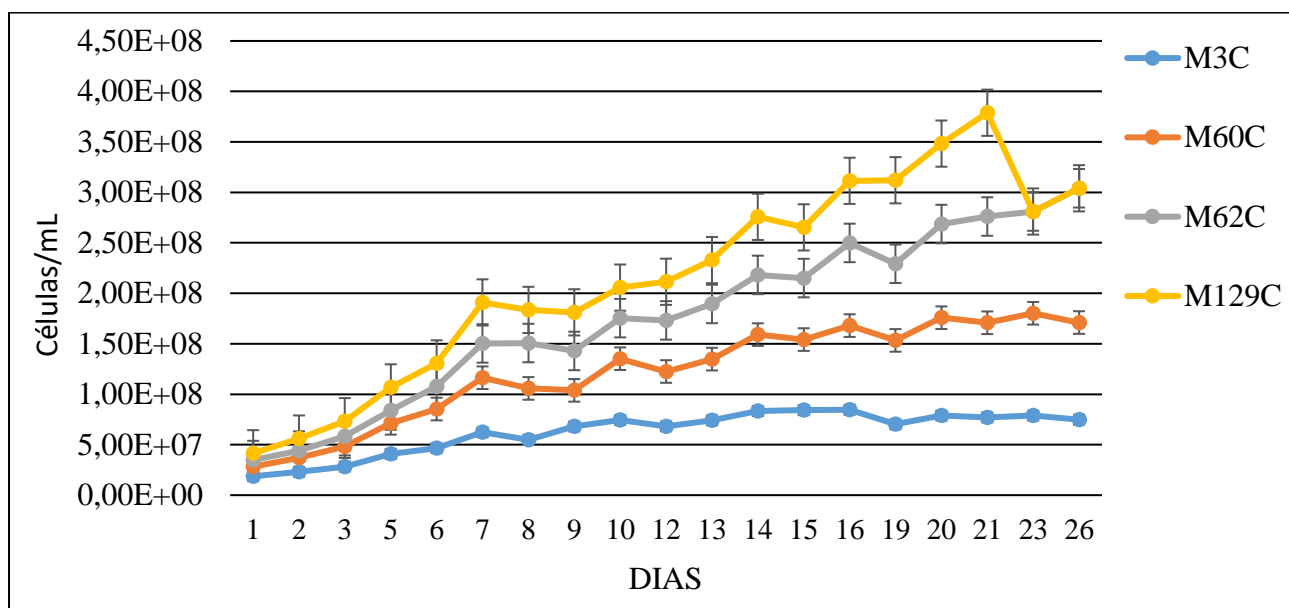
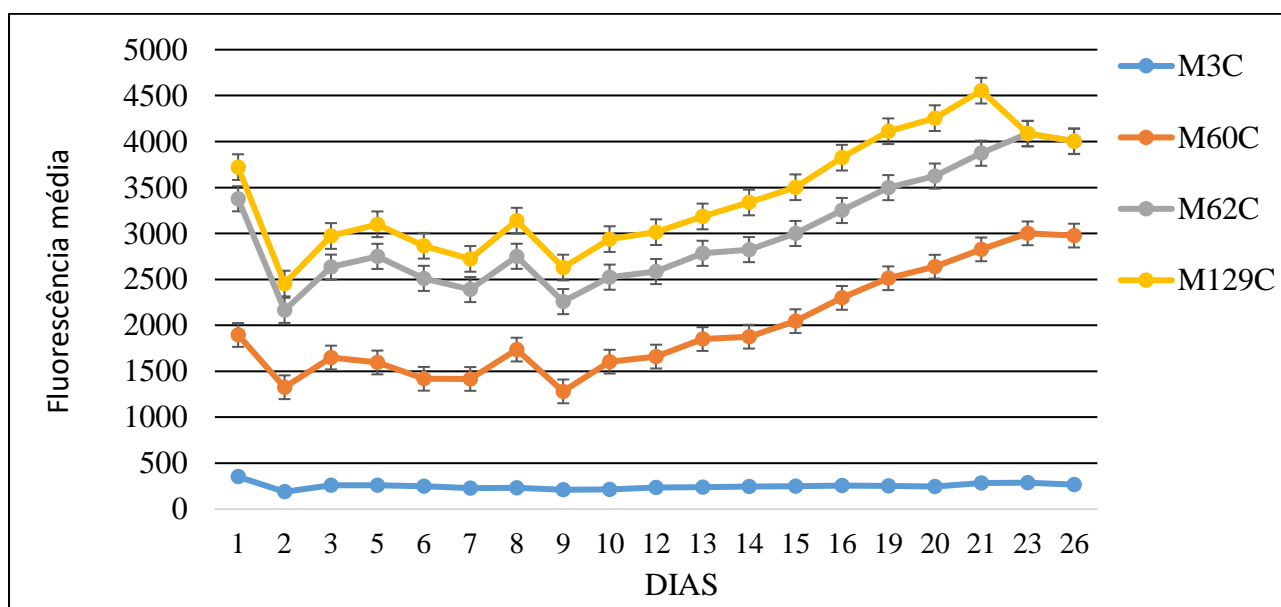
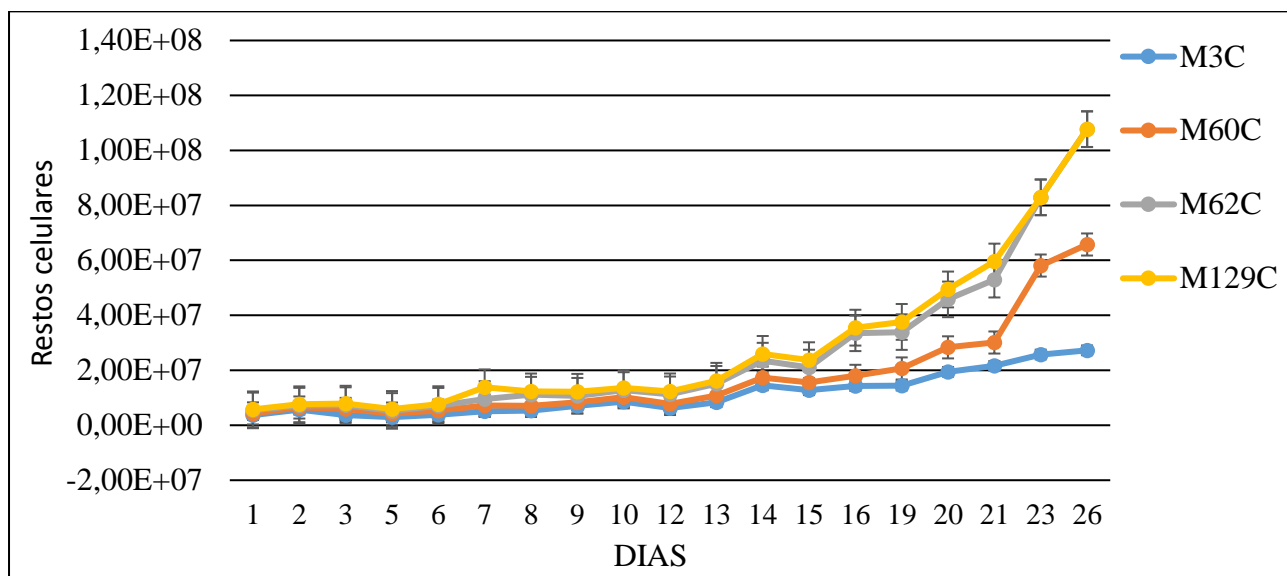


Figura 5. Curva da fluorescência média da clorofila das cianobactérias M3C, M60C, M62C e M129C.



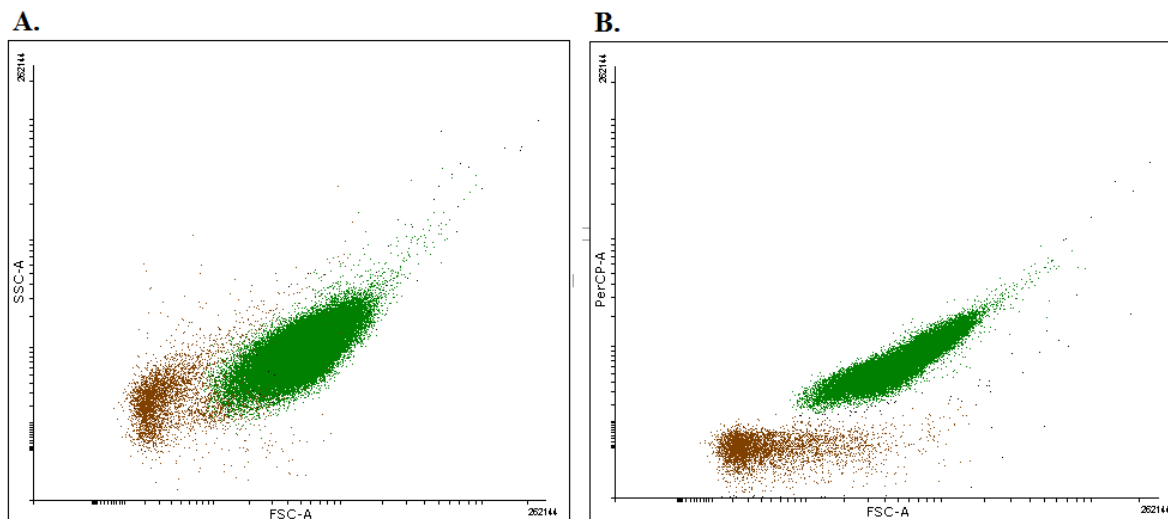
Observa-se uma pequena queda de fluorescência no primeiro dia do cultivo para todas as amostras, seguido de uma constância até o 14º dia, seguido de um aumento até o último dia analisado, exceto para a M3C, que se manteve baixo e constante durante todo o tempo.

Figura 6. Quantidade de restos celulares presentes nos cultivos das cianobactérias M3C, M60C, M62C e M129C.



Observa-se um aumento acentuado da quantidade de restos celulares a partir do 14º dia para todas as cianobactérias.

Figura 7. Citogramas representativos da cianobactéria M129C, no 21º dia de cultivo.

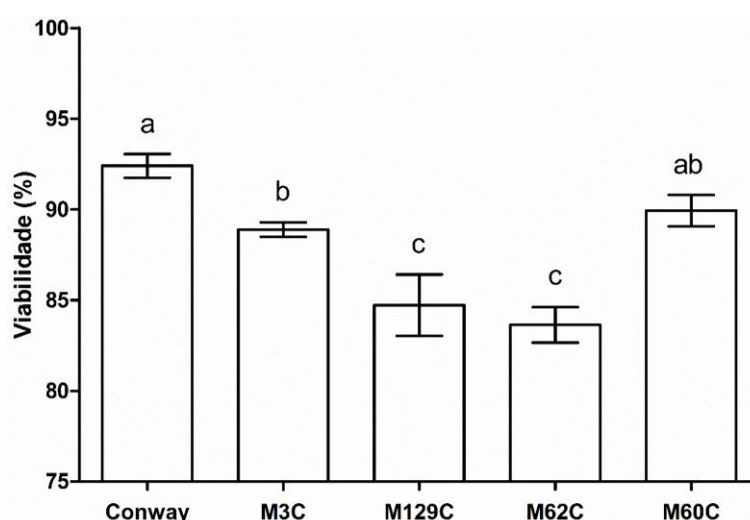


A. Gráfico de morfologia, FSC-A vs SSC-A. **B.** Gráfico de fluorescência vermelha (PerCP-A). A população de cor marrom representa os restos celulares e caracteriza-se por seu menor tamanho e menor granulosidade além de não emitir fluorescência vermelha. A população verde representa as células íntegras e caracteriza-se por seu maior tamanho e granulosidade, além de emitir fluorescência. FSC: tamanho celular; SSC: granulosidade interna; PerCP: fluorescência vermelha.

4.2. Efeito *in vitro* das cianobactérias nos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar*

A exposição dos hemócitos às CIs das cianobactérias levou a uma redução significativa ($P < 0,0001$) da viabilidade em relação ao controle com Conway ($92,4 \pm 0,6\%$). O efeito foi mais acentuado com o isolado M62C ($83,6 \pm 1,0\%$), seguido de M129C ($84,7 \pm 1,7\%$) e M3C ($88,9 \pm 0,4\%$). A CI do isolado M60C não alterou a viabilidade dos hemócitos ($89,9 \pm 0,8\%$) (**Figura 8**).

Figura 8: Viabilidade de hemócitos da ostra *Crassostrea gasar* após exposição às culturas integrais de cianobactérias.

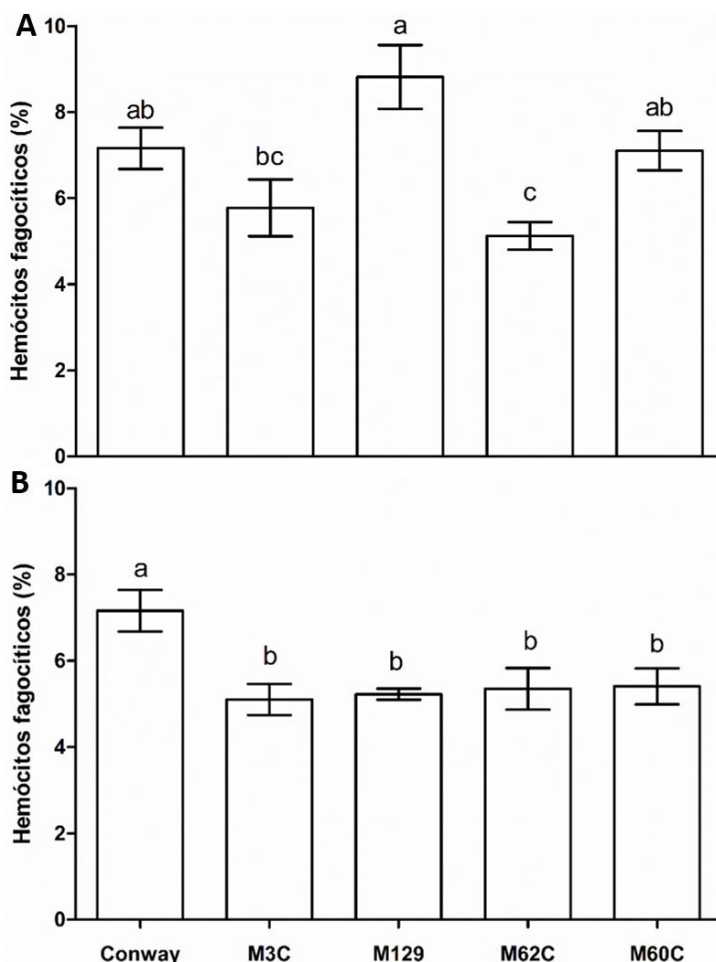


Viabilidade de hemócitos da ostra *Crassostrea gasar* após exposição (4 h) às culturas integrais de cianobactérias (M3C, M129C, M62C e M60C). Dados expressos como média \pm erro padrão. Letras indicam as diferenças significativas entre os tratamentos.

A análise da produção de ROS pelos hemócitos indicou que nenhuma CI (média $53,6 \pm 0,8\%$) ou PE (média $53,1 \pm 0,8\%$) promoveu modificação significativa em relação ao controle com Conway ($52,7 \pm 3,8$ U.A.).

A fagocitose de diferentes partículas foi avaliada em resposta ao tratamento com as cianobactérias. Não houve diferença significativa para a porcentagem de células que fagocitaram partículas inertes de látex quando expostas às CIs de todas as cianobactérias, exceto o isolado M62C ($P < 0,0001$; **Figura 9A**). Já para os PEs, a porcentagem de células fagocíticas variou significativamente em todos os tratamentos ($P = 0,0002$; **Figura 9B**). A fagocitose foi reduzida em resposta à CI de M62C ($5,1 \pm 0,3\%$) e não foi alterada com as demais. Já os PEs de todas as cianobactérias induziram uma redução significativa e similar da fagocitose (média de $5,3 \pm 0,1\%$).

Figura 9: Fagocitose (%) de partículas de látex pelos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar* após exposição às cianobactérias.



A. Cultura integral. **B.** Produtos extracelulares. Fagocitose (%) de partículas de látex pelos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar* após exposição curta (4 h) às cianobactérias (M3C, M129C, M62C e M60C). Dados expressos como média \pm erro padrão. Letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

No presente estudo, também foi avaliada a capacidade de fagocitose de partículas biológicas, o zymosan e trofozoítos de *P. marinus*, em resposta aos tratamentos com as cianobactérias.

A porcentagem de hemócitos que fagocitaram o zymosan não foi alterada pela exposição às CIs (média $11,4 \pm 0,7\%$) ou aos PEs (média $13,5 \pm 0,8\%$) das cianobactérias quando comparados ao tratamento com meio Conway ($14,4 \pm 1,4\%$). De modo similar, a porcentagem de granulócitos que fagocitaram *P. marinus* não foi alterada pela exposição às CIs (média $58,2 \pm 1,9\%$) ou as PEs ($67,2 \pm 0,2\%$) quando comparadas ao tratamento com meio Conway ($64,1 \pm 2,0\%$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Proliferação *in vitro* das cianobactérias

Os resultados indicaram que todos os isolados de cianobactérias estudados cresceram favoravelmente em meio Conway a 20°C. As cianobactérias permaneceram viáveis e em proliferação celular até o 26º dia de cultivo *in vitro*, mesmo sem renovação de meio, ou seja, sem adição de novos nutrientes. No entanto, a mudança de cor do cultivo e a grande quantidade de restos celulares a partir do 14º dia indicam que o cultivo entrou em fase de declínio, ou seja, de mortalidade, ainda que não se tenha observado uma fase estacionária típica como as observadas nos cultivos de microalgas marinhas (FIDALGO et al., 1998; HENDERSON et al., 2008; MANSOUR et al., 2005). Com isto esperava-se, em condições ótimas de nutrientes e renovação de meio, um número maior células ao final. Em ambientes naturais, sabe-se que algumas espécies de cianobactérias são bastante resistentes às condições extremas, como ressecamento, exposição a raios UV, choque térmico e baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes (FATHALLI et al., 2011). Florações naturais são extremamente influenciadas por fatores hidrológicos e pela quantidade de nutrientes presentes na água, seja ela doce ou salgada, sendo afetadas por urbanização e dejetos industriais e agrícolas, ricos em nitrogênio e fósforo, que podem aumentar a proliferação das cianobactérias (PAERL, 2008). Durante grandes florações, espécies bentônicas podem formar tapetes de até 70 cm de espessura no substrato (DASEY et al., 2005) e espécies planctônicas, como a *Anabaena* spp., florações com concentrações de 19.000 células/mL (BACKER et al., 2015).

Conhecer a proliferação em condições laboratoriais é importante, pois estas cianobactérias podem ser fonte de moléculas com potencial farmacológico ou biotecnológico (DAY; BENSON; FLECK, 1999; PAGLIARA; CAROPPO, 2011; ESSACK et al., 2014; FALAISE et al., 2016).

5.2. Efeito *in vitro* das cianobactérias nos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar*

Diversos estudos já reportaram o efeito de toxinas produzidas por organismos formadores de HABs na fisiologia e nos parâmetros imunológicos de bivalves, desde a mortalidade dos hemócitos, mudanças no funcionamento de tecidos, da capacidade de fagocitose e da produção de ROS (HÉGARET et al. 2007b; HÉGARET et al. 2009; ESTRADA et al. 2010; MELLO et al. 2012; MELLO et al. 2013).

As culturas integrais dos isolados de cianobactérias M3C, M129C e M62C afetaram

negativamente a sobrevivência dos hemócitos das ostras, o que indica que as cianobactérias possuem componentes tóxicos que interferem na fisiologia dos hemócitos. Em contrapartida, os produtos extracelulares não foram capazes de induzir morte celular (tais resultados encontram-se agrupados na **Tabela 1**). Estes resultados, indicam que os fatores responsáveis pela toxicidade podem não ser resultado de metabólitos liberados no meio extracelular, mas sim algo presente na própria célula. Martins et al. (2005) encontraram uma maior toxicidade nos extratos centrifugados de cianobactérias, indicando que possivelmente os compostos tóxicos estejam ligados à parede celular. Sabe-se que algumas cianobactérias são capazes de produzir metabólitos secundários altamente tóxicos, como a microcistina, que possui efeitos antibacterianos e antifúngicos (DIXON; AL-NAZAWI; ALDERSON, 2004). Martins et al. (2008) mostraram que cianobactérias do gênero *Synechocystis* causam inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, de hepatócitos de ratos e de células da linhagem humana HL-60. Muito embora a maioria dos estudos apontem os efeitos nocivos das cianobactérias aos seus metabólitos secundários tóxicos, como as hepatotoxinas microcistina e a nodularina (KANKAANPÄÄ et al., 2007; VUORINEN et al., 2009; DYBLE et al., 2011; SHAMS et al., 2014), é sabido que outros compostos, além dessas cianotoxinas, também são responsáveis por efeitos deletérios a organismos aquáticos, como peptídeos e inibidores de protease (MAZUR-MARZEK et al., 2015). Estudos já demonstraram que linhagens de cianobactérias que não produzem cianotoxinas conhecidas também causam efeitos tóxicos a outros organismos (VASCONCELOS; OLIVEIRA; TELES, 2001; KEIL et al., 2002; BAPTISTA et al., 2015). Apesar dos estudos relatados acerca da citotoxicidade dos metabólitos das cianobactérias, não encontramos no presente trabalho efeito na viabilidade dos hemócitos expostos aos produtos extracelulares dos isolados da Paraíba. Astuya et al. (2015) demonstraram que a saxitoxina, uma neurotoxina produzida por cianobactérias e dinoflagelados, afeta as funções celulares dos hemócitos, como a fagocitose e a produção de ROS. Tais diferenças de resultados podem ser explicadas pela falta de cianotoxinas liberadas extracelularmente nas cianobactérias estudadas no presente trabalho. Ainda, alguns estudos demonstraram que organismos vertebrados são mais afetados pelas cianotoxinas do que os invertebrados (KARJALAINEN et al., 2003; FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

Tabela 1. Efeito de cianobactérias em hemócitos de ostras *Crassostrea gasar*.

Parâmetros celulares	Culturas Integrais				Produtos extracelulares			
	M3C	M129C	M62C	M60C	M3C	M129C	M62C	M60C
Viabilidade	<	<	<	=	=	=	=	=
Produção de ROS	=	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose de Látex	=	=	<	=	<	<	<	<
Fagocitose de Zymosan	=	=	=	=	=	=	=	=
Fagocitose de <i>P. marinus</i>	=	=	=	=	=	=	=	=

Análise estatística dos efeitos das cianobactérias *Synechocystis* spp. nos hemócitos de *C. gasar* em comparação ao seu controle, meio Conway, pelo teste ANOVA *one way*, seguido de pós teste LSD. < : Valor inferior ao controle. = : Sem diferença do controle.

A produção de ROS é um dos principais mecanismos líticos de defesa dos bivalves, possuindo um efeito antimicrobiano importante (BACHÈRE, 2004; FANG, 2004; BARRACO; DA SILVA, 2008). A presença das culturas integrais de cianobactérias, entretanto, não provocou alterações na produção destes radicais tóxicos (**Tabela 1**). Já foi mostrado que hemócitos da ostra *C. gasar* têm a produção de ROS aumentada quando expostos a toxinas de dinoflagelados (MELLO et al., 2013). A ausência de um aumento de espécies reativas de oxigênio neste estudo indica que as cianobactérias não estão ativando vias de defesa das ostras contra patógenos, mesmo com as cianobactérias representando um risco de queda na viabilidade celular. Esse resultado é surpreendente, pois já foi demonstrado que hemócitos possuem a capacidade de reconhecer o LPS da parede celular das bactérias gram-negativas (TRIPP, 1992; COSTA et al., 2009), então as cianobactérias, por serem bactérias gram-negativas (HOICZYK; HANSEL, 2000), deveriam ativar respostas imunológicas nos hemócitos, como a produção de ROS. Entretanto, uma provável explicação para esse fato é que a parede celular das cianobactérias possua algumas diferenças comparadas à de outras bactérias gram-negativas,

como a maior espessura da camada de peptidoglicanos e a ausência de ácido teicóico e de ceto-deoxi-octulosonato, um componente comum do LPS das membranas bacterianas (vide revisão de Hoiczky e Hansel, 2000). Esse resultado contrasta com o estudo de Gélinas et al. (2014) que mostraram que hemócitos de mexilhões de água doce *Elliptio complanata* tem a produção de ROS diminuída quando expostos a extratos das cianobactérias também de água doce *Microcystis aeruginosa* e *Lyngbya wollei*.

Os produtos extracelulares de todos os isolados e o cultivo integral do isolado M62C das cianobactérias foram responsáveis pela redução da fagocitose de corpos estranhos sintéticos, no caso, as partículas de látex. Por outro lado, nenhuma das culturas integrais ou seus produtos extracelulares foram capazes de alterar a fagocitose de zymosan ou de trofozoítos de *P. marinus*, que são partículas orgânicas (**Tabela 1**). Isso indica que os processos envolvidos na fagocitose das três partículas são diferentes e são afetados por diferentes fatores. García-García et al. (2008) demonstraram que a fagocitose de zymosan e de partículas de látex é mediada de forma diferenciada entre os diferentes tipos de hemócitos, assim como por vias de sinalização diferentes. Lamprou et al. (2007) demonstraram que a fagocitose de partículas de látex por hemócitos de insetos está associada com a via de sinalização FAK/Scr e das MAPKs (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*). As cianobactérias aqui estudadas foram capazes de inibir a fagocitose de somente um dos compostos testados, o que possivelmente pode significar que elas estejam interferindo em vias de sinalização *upstream*. O bloqueio de vias *downstream* resultaria na inibição da fagocitose de várias partículas, pois impediria processos em comum para a fagocitose, como a polimerização dos filamentos de actina para emissão de pseudópodos para engolfar as partículas. Além, disso, os receptores dos hemócitos envolvidos no reconhecimento das diversas partículas são diferentes. Sabe-se que o reconhecimento do zymosan se dá por proteínas de ligação a β -1-3 glicanas; já descritas em bivalves (ITOH et al., 2010) e o de *P. marinus* se dá pelas galectinas (Cvgal e Cvgal1, VASTA et al., 2015); enquanto que os receptores de látex são ainda desconhecidos em invertebrados (LAMPROU et al., 2007). Em modelos vertebrados, se suspeita da participação de receptores tipo *Scavengers*, chamados MARCO (do inglês *Macrophage Receptor with Collagenous Structure*; KANNO; FURUYAMA; HIRANO, 2007; PALECANDA et al., 1999). Seria possível ainda pensar que no caso do receptor de látex, algum composto liberado pelas cianobactérias poderia estar competindo pelo sítio de reconhecimento, ocasionando a diminuição da fagocitose. Além disso, as cianobactérias testadas não foram fagocitadas pelos hemócitos (dados não mostrados), eliminando a hipótese de que os hemócitos estariam deixando de fagocitar outras partículas ao fagocitarem as cianobactérias.

6. CONCLUSÕES

- As cianobactérias testadas são facilmente cultivadas em meio de cultivo em condições laboratoriais e crescem por um longo período;
- As cianobactérias M3C, M129C e M62C poderiam conter em sua superfície componente(s) tóxico(s) que comprometem a viabilidade dos hemócitos da ostra *Crassostrea gasar*;
- As cianobactérias M3C, M129C, M60C e M62C produzem metabólitos potencialmente tóxicos que interferem na fagocitose de partículas estranhas inertes;
- As cianobactérias podem alterar as respostas de defesa da ostra *C. gasar*;
- Pesquisas futuras abordando outros fatores, como extratos contendo potenciais cianotoxinas ou lisados de cianobactérias poderiam ajudar na compreensão dos efeitos das cianobactérias nos hemócitos da ostra *C. gasar*.

7. REFERÊNCIAS

- ASTUYA, A. et al. Saxitoxin modulates immunological parameters and gene transcription in *Mytilus chilensis* hemocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 16, p. 15235–15250, 2015.
- AVILA-POVEDA, O. H. et al. Evidence for accumulation of *Synechococcus elongatus* (Cyanobacteria: Cyanophyceae) in the tissues of the oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). **Tissue and Cell**, v. 46, n. 5, p. 379–387, 2014.
- BACHÈRE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oysters *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n.1, p. 149–168, 2004.
- BACKER, L. C. et al. Cyanobacteria and Algae Blooms: Review of Health and Environmental Data from the Harmful Algal Bloom-Related Illness Surveillance System (HABISS) 2007–2011. **Toxins**. V. 7, p. 1048–1064, 2015.
- BAPTISTA, M. S. et al. Assessment of the non-protein amino acid BMAA in Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* after feeding with estuarine cyanobacteria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 12501–12510, 2015.
- BARRACCO, M. A.; DA SILVA, P. M. Hemolinfa e sistema imune. In: C Resgalla Jr, LI Weber, MB da Conceição (eds.). Rio de Janeiro, **Interciência**, p. 85–103, 2008.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 157–164, 2003.
- CARMICHAEL, W. W.; LI, R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. **Saline Systems**, v. 2, p. 1–13, 2006.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445–459, 1992.

- CATHERINE, Q. et al. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. **Water Research**, v. 47, p. 5464 – 5479, 2013.
- CHENG, T. C. Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds). Invertebrate blood cells. **Academic Press**, p. 233-300, 1981.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management. **E & FN Spon**, Londres, p. 416, 1999.
- COSTA, M. M. et al. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, p. 515–523, 2009.
- DASEY, M. et al. Investigations into the taxonomy, toxicity and ecology of benthic cyanobacterial accumulations in Myall Lake, Australia. **Marine and Freshwater Research**, v. 56, n. 1, p. 45, 2005.
- DAY, J. G.; BENSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 35, n. 2, p. 127–136, 1999.
- DIXON, R. A; AL-NAZAWI, M; ALDERSON, G. Permeabilising effects of sub-inhibitory concentrations of microcystin on the growth of *Escherichia coli*. **Microbiology Letters**, v. 230, p. 167–170, 2004.
- DONAGHY, L. et al. Hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* a year after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea. **Helgoland Marine Research**, v. 64, p. 349–35, 2010.
- DYBLE, J. et al. A kinetic study of accumulation and elimination of microcystin-LR in yellow perch (*Perca flavescens*) tissue and implications for human fish consumption. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2553–2571, 2011.
- EPAGRI. **Síntese Informativa da Maricultura**, Florianópolis. 2015.
- ESSACK, M. et al. Chemical compounds toxic to invertebrates isolated from marine cyanobacteria of potential relevance to the agricultural industry. **Toxins**, v. 6, n. 11, p. 3058–

3076, 2014.

ESTRADA, N. et al. Effects of induced paralysis on hemocytes and tissues of the giant lionspaw scallop by paralyzing shellfish poison. **Marine Biology**, v. 157, p. 1401–1415, 2010.

FALAISE, C. et al. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. **Marine Drugs**, v. 14, n. 9, p. 159, 2016.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature**, v. 2, p. 820–832, 2004.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. **Fishery and Aquaculture**, 2016.

FATHALLI, A. et al. Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 303–310, 2011.

FERRÃO-FILHO, A. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2729–2772, 2011.

FIDALGO, J. P. et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 166, p. 105–116, 1998.

FOURNIER, M. et al. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. **American Zoologist**, v. 40, p. 412–420, 2000.

GALIMANY, E. et al. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. **Harmful Algae**, v. 7, p. 702–711, 2008.

GARCÍA-GARCÍA, E. et al. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 637–653, 2008.

GÉLINAS, S. et al. Responses of freshwater mussel (*Elliptio complanata*) hemocytes exposed in vitro to crude extracts of *Microcystis aeruginosa* and *Lyngbya wollei*. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 2, p. 260–266, 2014.

- GONÇALVES-SOARES, D. et al. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. **Marine Environmental Research**, v. 75, p. 54–61, 2012.
- HALLEGRAEFF, G.M.; HARA, Y. Taxonomy of harmful marine raphidophytes. In Hallegraeff, G.M. et al. eds. Manual on Harmful Marine Microalgae. **IOC Manuals and Guides**, v. 33, p. 365-371, 1995.
- HÉGARET, H. et al. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. **Aquatic Toxicology**, v. 84, 469–479, 2007b.
- HÉGARET, H. et al. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve mollusks. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, v. 249-266, 2011.
- HÉGARET, H. et al. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 371, 112–120, 2009.
- HÉGARET, H. et al. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effect on oyster hemocytes. **Marine Biology**, v. 152, p. 441-447, 2007a.
- HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H. Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. **Harmful Algae**, v. 4, p. 201-209, 2005.
- HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow cytometric analysis of haemocytes from Eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 249–265, 2003.
- HENDERSON, R. K. et al. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3435–3445, 2008.
- HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1191–1199, 2000.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. 2013. Disponível em:

- <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/default.shtm>>. Acesso em: 10 set. 2016.
- ITOH, N. et al. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 158, n. 1, 2010.
- KANKAANPÄÄ, H. et al. Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis*. **Chemosphere**, v. 68, p. 1210–1217, 2007.
- KANNO, S.; FURUYAMA, A.; HIRANO, S. A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 2, p. 398–406, 2007.
- KARJALAINEN, M. et al. Uptake and accumulation of dissolved, radiolabeled nodularin in Baltic Sea zooplankton. **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 52–60, 2003.
- KEIL, C. et al. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. **Water Research**, v. 36, p. 2133–2139, 2002.
- LAMBERT, C. et al. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 225–240, 2003.
- LAMPROU, I. et al. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocyte. **Immunology**, v. 121, p. 314–327, 2007.
- LANDSBERG, J. H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, p. 113–390, 2002.
- LAVANDER, H.D. et al. O desenvolvimento da ostreicultura em Pernambuco. **Boletim técnico-científico do CEPENE**, Tamandaré. v. 15, n. 2, 2007.
- MANSOUR, M. P. et al. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C24-C28 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 4, p. 287–300, 2005.
- MARTINS, R. et al. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. **Toxicon**,

- v. 50, n. 6, p. 791–799, 2007.
- MARTINS, R. et al. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. **Toxicon**, v. 46, p. 454–464, 2005.
- MARTINS, R. F. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Assessment of Marine Cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. **Marine Drugs**, v. 6, n. 1, p. 1 – 11, 2008.
- MASÓ, M.; GARCÉS, E. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 10-12, p. 620–630, 2006.
- MAZUR-MARZEC, H. et al. *Nodularia spumigena* Peptides - Accumulation and Effect on Aquatic Invertebrates. **Toxins**, v. 7, p. 4404–4420, 2015.
- MELLO, D. F. et al. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. **Harmful Algae**, v. 26, p. 45–51, 2013.
- MELLO, D.F. et al. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, p. 583–597, 2012.
- MOREIRA, C.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Phylogeny and biogeography of cyanobacteria and their produced toxins. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4350–4369, 2013.
- NEGRI, A. P. et al. Effects of the bloom-forming alga *Trichodesmium erythraeum* on the pearl oyster *Pinctada maxima*. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 91–102, 2004.
- PAERL, H. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In: HUDNELL, H. K. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2008. p. 217 – 237.
- PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1349-1363, 2012.
- PAGLIARA, P.; CAROPPO, C. Cytotoxic and antimitotic activities in aqueous extracts of eight cyanobacterial strains isolated from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. **Toxicon**, v. 57, n. 6, p. 889–896, 2011.

- PALECANDA, A. et al. Role of the Scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1497–1506, 1999.
- PUSHPARAJ, B.; PELOSI, E.; JÜTTNER, F. Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 6, p. 527–530, 1998.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- ROCHA, M. S. P. et al. O uso dos recursos pesqueiros no estuário do rio Mamanguape, Estado da Paraíba, Brasil. **Interciencia**, v. 33, p. 903-909, 2008.
- SCHMITT, P. et al. Immune responses in the pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. In: QIN, J. G. **Oysters**. Austrália: Nova, 2011. cap. 9.
- SHAMS, S. et al. Experimental models of microcystin accumulation in *Daphnia magna* grazing on *Planktothrix rubescens*: Implications for water management. **Aquatic Toxicology**, v. 148, p. 9–15, 2014.
- SHUMWAY, S. E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. **Journal of The World Aquaculture Society**, v. 21, p. 35-104, 1990.
- SMITH, P. T. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 857-869, 1996.
- SONG, L. et al. Bivalve Immunity. In: Soderhall K (ed). **Invertebrate Immunity**. Springer Science, Austin, p. 44-65, 2010.
- SOUDANT, P.; E CHU, F. L.; VOLETY, A. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. **Journal of invertebrate pathology**, v. 14, p. 196–216, 2013.
- TRIPP, M. R. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 222–227, 1992.

- VASCONCELOS, J. F. et al. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 39, n. 2, p. 1-20, 2011.
- VASCONCELOS, V.; OLIVEIRA, S.; TELES, F. O. Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. **Toxicon**, v. 39, p. 1461–1470, 2001.
- VASTA, G. R. et al. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 94–106, 2015.
- VUORINEN, P. J. et al. Accumulation and effects of nodularin from a single and repeated oral doses of cyanobacterium *Nodularia spumigena* on flounder (*Platichthys flesus* L.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 164–173, 2009.
- WALNE, P. R. Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Helgoländer wiss. Meeresunters**, v. 20, p. 514-525, 1970.
- WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 995–1022, 2007.
- WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 201–218, 2005.