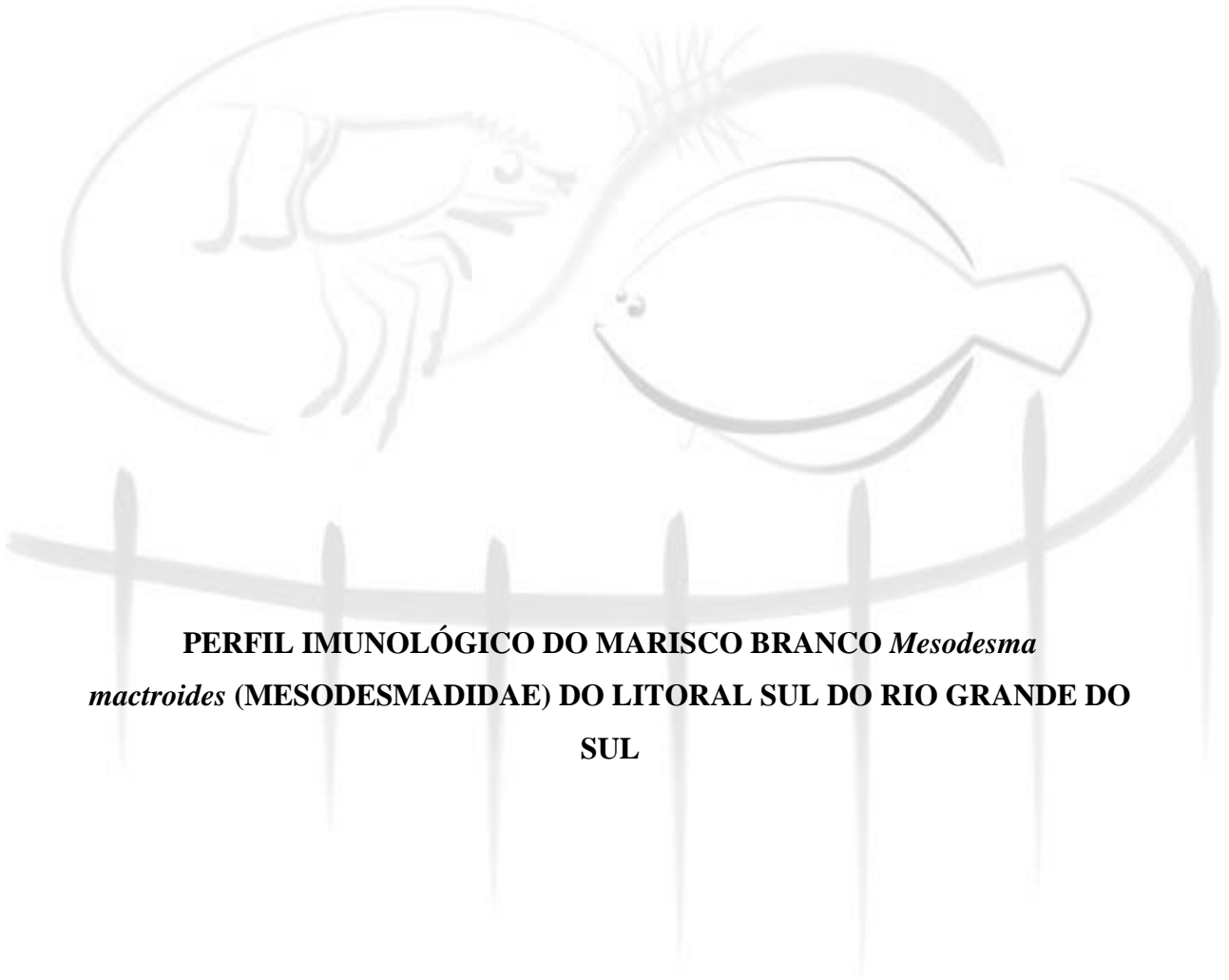


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**PERFIL IMUNOLÓGICO DO MARISCO BRANCO *Mesodesma*
mactroides (MESODESMADIDAE) DO LITORAL SUL DO RIO GRANDE DO
SUL**

JUAN JETHRO SILVA SANTOS

Rio Grande - RS, Brasil

Agosto 2014

1 **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**

2 **INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**

3 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

4
5
6
7 **PERFIL IMUNOLÓGICO DO MARISCO BRANCO *Mesodesma***

8 ***mactroides* (MESODESMADIDAE) DO LITORAL SUL DO RIO GRANDE DO**
9 **SUL**

10
11
12
13 **JUAN JETHRO SILVA SANTOS**

14
15
16 Dissertação apresentada como parte dos
17 requisitos para obtenção do grau de mestre
18 em Aquicultura no programa de Pós-
19 Graduação em Aquicultura da Universidade
20 Federal do Rio Grande – FURG.

21
22 Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Romano

23
24 **Rio Grande - RS, Brasil**

25 **Agosto 2014**

26	Índice	
27		
28	Resumo.....	1
29	Introdução Geral.....	2
30	Bivalves marinhos com potencial aquícola.....	2
31	Marisco branco (<i>Mesodesma mactroides</i>).....	3
32	Problemática ambiental.....	4
33	Imunologia de moluscos bivalves.....	5
34	Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH).....	7
35	Apoptose.....	8
36	Histopatologia.....	10
37	Objetivos.....	11
38	Referências.....	11
39	Artigo em Anexo: Perfil Imunológico do Marisco Branco <i>Mesodesma</i>	
40	<i>Mactroides</i> (MESODESMADIDAE) do Litoral Sul do Rio Grande do	
41	Sul.....	20
42	Resumo.....	22
43	Introdução.....	23
44	Material e Métodos.....	25
45	Resultados.....	27
46	Discussão.....	32
47	Referências.....	36
48	Conclusões gerais e perspectivas futuras.....	42
49		

50 **Agradecimentos**

51

52 A CAPES e a CNPq por me financiar durante o curso de pós-graduação.

53 A toda minha família, em especial: Emanuel Santos, Joelina, Emanuel Jr., Jaciara,
54 Dyego e Felipe, minha base educacional e emocional, que sem eles nada seria possível
55 em minha vida.

56 Aos meus amigos mais próximos que conhecem minha trajetória de vida e luta, e que
57 sempre acreditaram em mim e no meu trabalho, com zelo e orgulho.

58 Ao Dr. Romano, por aceitar o desafio ao me orientar academicamente, porém seu
59 desafio foi além dos conhecimentos profissionais, me ajudando inúmeras vezes com
60 ensinamentos de vida.

61 Ao Dr. Tesser, que conseguiu, com conselhos e frases motivadoras, me por pra cima,
62 me ajudando de certa forma a concluir esse trabalho.

63 Ao Dr. “Diogão” que possui a arte de ensinar, me ajudando incansavelmente e
64 pacientemente em todo período de pesquisa e conclusão da mesma.

65 A todos os colegas e amigos da EMA, que me ajudaram nas coletas, no laboratório e
66 principalmente na convivência e adaptação, em especial ao meu amigo Mário “Junim”
67 que hoje é um grande irmão.

68 A todos os funcionários da EMA, que abrange do motorista, faxineiras, vigilantes aos
69 professores, pelo apoio, carinho e respeitos incondicionais todos os dias.

70 E a Lisiane, por me trazer de volta a realidade, apoiando e acreditando em mim como
71 pessoa e profissional, e por aceitar me acompanhar nessa etapa da vida.

72

73 **Resumo**

74 O marisco branco *Mesodesma mactroides* foi historicamente um recurso
75 pesqueiro importante no litoral extremo sul do Brasil, Uruguai e Argentina, entretanto,
76 seus estoques atuais encontram-se dizimados devido a mortalidades massivas, sem
77 causa definida, e a sobre-exploração, o que impossibilita a sua utilização a nível
78 comercial. Neste contexto, o objetivo do seguinte trabalho foi compreender, através de
79 um estudo básico, o estado do sistema imunológico da espécie em questão, em seis
80 diferentes pontos, com diferentes exposições antrópicas (Molhes da Barra, Estação
81 Marinha de Aquicultura-EMA, Navio Altair, Farol de Sarita, Farol do Albardão e
82 Molhes da Barra-Chuí/RS), durante as quatro estações do ano. Os parâmetros hemato-
83 imunológicos selecionados para tal avaliação foram: caracterização e contagem
84 diferencial de hemócitos, índice apoptótico e histopatologia. Na caracterização de
85 hemócitos do marisco branco foram encontrados dos tipos, os hialinos e granulares. A
86 contagem diferencial de hemócitos não demonstrou diferenças significativas nos
87 organismos coletados na primavera e outono, porém no verão e inverno observaram-se
88 diferenças significativas entre os diferentes pontos. O índice apoptótico sofreu maior
89 variação nos Molhes da Barra, no verão, subtendendo que esses organismos se
90 encontram mais imunodebilitados. As análises histopatológicas mostraram a ocorrência
91 dos protozoários *Trichodina* sp. e dos helmintos da classe Turbellaria, porém não houve
92 diferenças significativas nos diferentes pontos e estações. Os resultados deste trabalho
93 demonstraram que ações antropogênicas associadas a variações ambientais (temperatura
94 e salinidade) podem estar afetando o sistema imune do *M. Mactroides*, porém, mais
95 estudos precisam ser realizados, para contribuir com um futuro manejo e a
96 malacocultura dessa espécie.

97 Palavras - chave: *Mesodesma mactroides*, sistema imunológico, malacocultura.

98

99

100

101

102

103 **Introdução Geral**

104 **Bivalves marinhos com potencial aquícola**

105 A aquicultura é a produção, processamento e comercialização de organismos
106 biológicos (ou seus produtos derivados) pertencentes a um sistema aquático (FAO
107 2014). Esta atividade é interdisciplinar e envolve tanto as ciências biológicas, quanto as
108 engenharias e as ciências socioambientais (Arana 1999).

109 A produção aquícola mundial total chegou a 90,4 milhões de toneladas em 2012,
110 com um valor estimado em 144 bilhões de dólares (FAO 2014). Neste contexto, a
111 maricultura é um dos principais contribuintes para tais valores, pois é um dos setores
112 que mais cresce no cenário global de produção industrial de alimentos, a uma taxa
113 média de 10,6% ao ano tornando-se uma importante fonte de alimentos para o consumo
114 humano, entre outros motivos, pelo baixo custo de produção e pela rentabilidade que
115 esta atividade proporciona (Brandini *et al.* 2000, Souza Filho *et al.* 2004).

116 Um dos ramos da maricultura é a malacocultura, atividade direcionada ao
117 cultivo de moluscos, que em 2012, contribuiu (no cenário mundial) com 13,4 milhões
118 de toneladas produzidas, com destaque principalmente a moluscos bivalves (FAO
119 2014). Porém, apesar da importância econômica dos moluscos marinhos para o homem,
120 principalmente como fonte de alimento, os estudos realizados ainda são muito escassos
121 quando comparados ao número de espécies existentes. A maior parte das espécies de
122 bivalves de areia é desprivilegiada em termos de dados biológicos básicos (Marques
123 2004) e isso pode implicar em vários problemas como, dificuldades de monitoramento e
124 gestão desses estoques naturais.

125 Segundo Urban (2000), para a completa avaliação de uma espécie de bivalve
126 com potencial de cultivo é necessário avaliar sua biologia, crescimento e sobrevivência
127 em condições de laboratório, para posteriormente observar seu desempenho em sistemas
128 de cultivo.

129 Neste sentido, com o aumento da demanda e da produção globalizada, a
130 América latina está investindo em cultivo de espécies exóticas valiosas de bivalves,
131 como a ostra do pacífico *Crassostrea gigas* e o mexilhão azul *Mytilus galloprovincialis*,
132 e em espécies nativas, como os mexilhões, *Mytilus chilensis* e *Perna perna*, vieiras,
133 *Nodipecten nodosus*, dentre outras como, o bergigão, *Anomalocardia brasiliana* e o
134 sururu, *Mytella falcata* (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2008, MPA 2013).

135 A família Mesodesmatidae está representada por moluscos de areia que
136 apresentam importância socioeconômica em diversas regiões do mundo, sendo
137 apontadas como promissoras para aquicultura, como é o caso das espécies “toheroa”
138 *Paphies ventricosa* e “pipi” *Paphies australis* na Nova Zelândia (Hooker 1997) e da
139 “macha” *Mesodesma donacium* no Chile e Peru (Uriarte 2008).

140 As espécies *P. australis* e *M. donacium* já possuem formas de cultivos em fase
141 experimental, cujos estudos buscam o controle reprodutivo, produção de larvas e pós-
142 larvas, maturação gonadal, engorda com diversos tipos de dietas e ciclo de vida
143 completo em ambientes controlados em laboratório (Hooker 1997, Uriarte 2008, Mamat
144 & Alfaro 2014). O objetivo com o cultivo dessas espécies é a diversificação da
145 produção aquícola com espécies nativas, permitindo menor pressão da pesca sobre
146 algumas espécies em risco de superexploração, além das mesmas serem importantes
147 fontes de renda e alimentar nas regiões que são endêmicas (Uriarte 2008).

148 No litoral do extremo sul do Brasil, no Uruguai e na Argentina, o marisco
149 branco (também chamado de “almeja amarilla”) *Mesodesma mactroides*
150 (Mesodesmatidae) é um espécie nativa que por várias décadas vindo sendo alvo de
151 estudos (Herrmann *et al.* 2011). Esta espécie se destaca tanto por possuir um valor
152 histórico como recurso pesqueiro (Coscarón 1959), quanto pela sua densidade
153 populacional e tamanho (Oliver *et al.* 1971), uma vez que o maior espécime coletado
154 chegou a apresentar o comprimento de concha de 98 mm (Gianuca 1975).

155 **Marisco branco (*Mesodesma mactroides*)**

156 Segundo Rios (1994), a distribuição do marisco branco vai desde Ilha Grande,
157 RJ (23°8'26"S 44° 14'50" O) até o sul da Província de Buenos Aires (36°9'26"
158 60°34'11"O), Argentina. Fiori & Defeo (2006) afirmam que o centro da distribuição
159 geográfica dessa espécie está localizado entre a praia do Cassino (32°14'39.9"S
160 52°12'15.5" O) e a *Barra del Chuy* (33°44'36"S 53°22'04"O), onde o crescimento e
161 abundância de indivíduos são maiores que nas demais localizações.

162 O marisco branco (Figura 1) é um bivalve com período larval planctônica, que
163 habita a zona entremarés de praias arenosas de regimes subtropicais e temperados, onde
164 vivem agregados (Bergonci 2005). Segundo Defoe (1998), considera-se recruta o
165 animal de até 10 mm, juvenis com tamanho entre 10 e 43 mm e os adultos com mais de
166 43 mm de comprimento. São suspensívoras, filtradoras de microalgas e material em
167 suspensão, assim como sedimentívoras, alimentando-se de detritos no sedimento (Defeo

168 & Scarabino 1990). Devido a essa forma de alimentação, metais pesados, toxinas e
169 outras substâncias nocivas aos seres vivos ficam incorporados aos seus tecidos, o que os
170 torna bons indicadores biológicos, sendo importantes aliados no monitoramento e
171 controle da qualidade da água dos oceanos e outros mananciais hídricos em que estejam
172 presentes (Mansur *et al.* 1994, Gil & Thomé 1998).



173

174

Figura 1 - Espécime de *Mesodesma mactroides* (marisco branco).

175

Problemática ambiental

176

177

178

179

180

A espécie *Mesodesma mactroides* tem sido explorado em praias do Brasil, Uruguai e Argentina por pesca comercial e de lazer, desde a década de 1940 (Defeo 2003). Na Argentina, por exemplo, registrou-se exploração máxima de 1.079 toneladas no ano de 1953, mas a pesca foi proibida em 1956 pelo intuito de recuperação dos estoques naturais (Coscaron 1959), porém não se obteve êxito.

181

182

183

184

185

Atualmente, as populações de *M. mactroides* encontram-se drasticamente reduzida devido à exploração excessiva durante as décadas de 1960, 1970 e 1980, e a sucessivos surtos de mortalidades massivas que praticamente dizimaram seus principais estoques populacionais (Odebrecht *et al.* 1995, Mendes 1995, Fiori & Cazzaniga 1999, Cremonte & Figueiras 2004).

186

187

188

189

190

191

Narchi (1981) menciona que a predominância do marisco sobre os demais organismos simpátricos pode ser um bom indicativo de que o ambiente está em ótimas condições, ou seja, um ambiente preservado. Em 1980 foi registrada a abundância populacional de *M. mactroides* variando de 920 a 8450 indivíduos/m² nas praias arenosas do Sul do Brasil (Gianuca 1985). Entretanto em estudos mais recentes, observa-se um acentuado declínio populacional da espécie (Bergonci 2005).

192 Vários autores sugerem que extrações ilegais e o impacto das atividades
193 turísticas são os principais fatores para o fracasso da recuperação de estoque (Bastida *et*
194 *al.* 1991, Bastida *et al.* 1996, Herrmann 2009), assim como, o crescimento populacional
195 nas regiões litorâneas, pois bivalves de areia em geral, são extremamente suscetíveis à
196 poluição e ao pisoteio humano (Fontana *et al.* 2003). Além disso, surtos de mortalidade
197 podem ser resultado de múltiplos fatores, incluindo temperaturas elevadas e estresse
198 fisiológico associado à maturação sexual (Gouletquer *et al.* 1998). A exposição ao
199 estresse físico, causado por alterações de temperatura e salinidade, como o que ocorre
200 em desembocaduras de grandes rios ou até mesmo de córregos é desfavorável ao
201 desenvolvimento dos bivalves (Coscarón, 1959, Olivier *et al.* 1971).

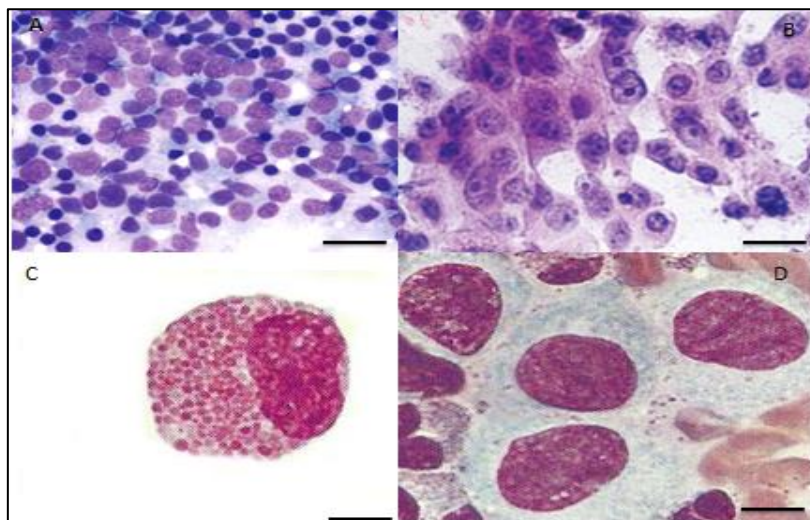
202 Estas variações dos parâmetros ambientais podem afetar os mecanismos de
203 defesas de invertebrados marinhos, podendo deixa-los mais suscetíveis a doenças e
204 parasitos (Fisher & Newell 1986, Cheng & Combes 1990, Matozzo *et al.* 2007).
205 Recentemente foram relatadas mortalidades em juvenis de marisco branco com infecção
206 por bactérias do gênero *Rickettsia* no litoral sul do Rio Grande do Sul, Brasil (Carvalho
207 *et al.* 2013a), fortalecendo a ideia que estudos patológicos e sanitários são de extrema
208 importância para cultivo e manejo de moluscos bivalves (Cáceres-Martínez & Vásquez-
209 Yeomans, 2008).

210 Dessa forma o conhecimento sobre imunologia e patologia de moluscos bivalves
211 é necessário para compreender o efeito das modificações ambientais e antrópicas em
212 espécies cultivadas e com potencial para cultivo, sendo uma ferramenta para elaboração
213 de estratégias e gestão desses recursos naturais.

214 **Imunologia de moluscos bivalves**

215 Os moluscos possuem um sistema imunológico inato, sem a presença de
216 anticorpos, receptores específicos e nem células de memória como nos vertebrados. Este
217 sistema imune está essencialmente ligado ao seu sistema circulatório de hemolinfa
218 (Galloway & Depledge 2001). Em moluscos bivalves, o sistema imunológico, possui
219 mecanismos de defesas que envolvem reações celulares, cujo o ponto central da
220 resposta imune é a fagocitose. Esta fagocitose é desempenhada por células circulantes
221 na hemolinfa, denominadas hemócitos (Cheng 1996, Betti *et al.* 2006). Relata-se
222 comumente a ocorrência de dois grupos básicos de hemócitos em bivalves; os ricos em
223 grânulos, denominados hemócitos granulares ou *granulócitos* (HG), e os com pouco ou

224 nenhum grânulo, conhecidos como hemócitos hialinos (HH) (Hine 1999, Vargas-
225 Albores & Barraco 2001, Matozzo *et al.* 2008) (Figura 2).



226

227 **Figura 2** – **A:** Hemócitos de *M. mactroides* com população mista, composta por hemócitos granulares e
228 hialinos, Giemsa Bar = 50 μm . **B:** Hemócitos agrupados com componentes granulares e hialinos, Giemsa
229 Bar = 70 μm . **C:** Hemócitos granulares com abundantes grânulos no citoplasma, no núcleo e periferia
230 celular, Giemsa Bar 150 μm . **D:** Hemócitos hialinos, agranulares, Giemsa Bar = 150 μm .

231 Os HG parecem ser de modo geral, as células mais ativas a respostas
232 imunológicas de moluscos, e embora sua composição e função possam variar entre os
233 bivalves, estas células são capazes de fagocitar ativamente microrganismos, produzir
234 enzimas digestivas, gerar espécie reativa de oxigênio, produzir proteínas de
235 reconhecimento como lectinas e sintetizar diferentes tipos de proteínas e peptídeos
236 antimicrobianos (Hine 1999, Vargas-Albores & Barraco 2001, Boulanger *et al.* 2006).
237 Enquanto que, os HH estão envolvidos no reparo de feridas e cicatrização do tecido e
238 também no processo de fagocitose, porém com menos eficiência que os granulares
239 (Aladaileh *et al.* 2007, Kuchel *et al.* 2010). Assim neste contexto, a diminuição ou
240 ausência de hemócitos granulares poderia estar relacionada a uma maior suscetibilidade
241 destes bivalves a infecções e às mortalidades (Schleder *et al.* 2008).

242 Embora esses dois tipos de hemócitos sejam identificados e estudados em várias
243 espécies de bivalves, tais como *Tapes philippinarum* (Cima *et al.* 2000), *Mercenaria*
244 *mercenaria* (Perrigault *et al.* 2011), *Mytilus* spp. (Canesi *et al.* 2012), as informações
245 relacionadas aos parâmetros imunes são limitadas (Bibby *et al.* 2008). Segundo
246 Donaghy & Volety (2011), a caracterização dos hemócitos sobre condições ambientais
247 naturais, é essencial para entender melhor as respostas mediadas pelo sistema imune de
248 moluscos exposto a estresses ambientais, antropogênicos e patológicos.

249 Na hemolinfa de moluscos bivalves ocorrem reações humorais, onde atuam
250 proteínas e outras moléculas dissolvidas no plasma, como peptídeos antimicrobianos
251 (PAM), que realizam atividades líticas e estimulam a fagocitose (Vargas-Albores &
252 Barraco 2001).

253 Os PAM são amplamente expressos nos organismos e têm sido vinculados à
254 imunidade dos invertebrados (Vargas-Albores & Barraco 2001). Estes PAM
255 representam o principal sistema de defesa humoral contra infecções, exibindo um amplo
256 espectro de mecanismo de ação, alterando na maioria das vezes a integridade da
257 membrana de agentes patógenos, tais como bactérias (Marsh & Goode 1994).

258 Nos últimos 20 anos, centenas de PAM têm sido encontrados em plantas e em
259 fluidos corporais dos animais multicelulares, de molusco aos seres humanos (Zasloff
260 2002). Alguns destes peptídeos são produzidos constitutivamente enquanto que outros
261 são induzidos em resposta à infecção ou inflamação (Ganz 2003). Embora os PAM
262 mostrem uma variedade de formas e composições de aminoácidos, muitos dos quais são
263 encontrados em vertebrados, um dos mais importantes são as defensinas (Gueguen *et al.*
264 2006).

265 Um modelo interessante da ação das defensinas é observado em um epitélio
266 infectado. As células epiteliais sintetizam defensinas antimicrobianas e estimulam uma
267 resposta inflamatória, que tenta destruir os agentes microbianos, enquanto que, outras
268 defensinas são introduzidas nos hemócitos granulosos estimulando a fagocitose e a lise
269 intracelular dos micróbios ingeridos (Ganz & Lehrer 1995, Ganz & Lehrer 1997).

270 **Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)**

271 A eficácia da resposta imune tem sido associada com o número de hemócitos em
272 circulação, assim como a relação entre eles, que é denominada contagem diferencial de
273 hemócitos (CDH) (Dang *et al.* 2012, Comesaña *et al.* 2012). Em bivalves, a CDH pode
274 variar acentuadamente entre os indivíduos e pode ser influenciada tanto por fatores
275 exógenos como, temperatura, salinidade e poluentes, quanto por fatores endógenos,
276 infecção, idade e período reprodutivo dos animais (Pipe & Coles 1995, Mayrand *et al.*
277 2005, Monari *et al.* 2007, Matozzo *et al.* 2008).

278 Dessa forma, a CDH é um parâmetro imunológico utilizado para expressar as
279 condições de saúde de invertebrados. A modulação desse parâmetro é utilizada em
280 diferentes espécies sob condições de estresse ambiental e/ou fisiológico e durante

281 infecções, podendo aumentar ou diminuir seus valores, dependendo do tipo e tempo de
282 exposição ao agente estressor (Rodriguez & Le Moullac 2000).

283 Especificamente, parâmetros ambientais como temperatura e salinidade variam
284 sazonalmente alterando a resposta imune dos organismos afetados. Logo a compreensão
285 de como um organismo vai responder aos estresses do meio ambiente em diferentes
286 sazonalidades é crucial para prever como o estresse ambiental causa impacto, tanto na
287 resistência dos organismos, deixando-os mais suscetível a doenças quanto à dinâmica
288 populacional das espécies (Moret & Schmid-Hempel 2000, Ellis *et al.* 2011).

289 **Apoptose**

290 A apoptose, também denominada morte celular programada (Kerr *et al.* 1972) é
291 um processo natural do ciclo celular animal podendo ser caracterizada como um
292 fenômeno biológico, não pertencendo ao sistema imune propriamente dito, mas
293 auxiliando biologicamente o sistema em várias circunstâncias, por exemplo, no controle
294 de infecções virais (Roulston *et al.* 1999). Quando um vírus entra na célula, esta entra
295 em apoptose como um mecanismo de “suicídio altruísta”, ou seja, a célula morre antes
296 que o vírus se replique, impedindo sua propagação (Romero *et al.* 2011). Desta forma,
297 avaliar a quantidade de hemócitos que estão em apoptose, através do índice apoptótico,
298 indica a capacidade de resistência a infecções virais, processo importante para
299 compreender o estado de saúde da espécie em questão (Roulston *et al.* 1999, Sokolova
300 2009, Hughes *et al.* 2010). Bivalves são altamente suscetíveis a mudanças climáticas,
301 poluentes e patógenos, onde o processo de apoptose pode ser necessário para assegurar
302 o funcionamento normal dos hemócitos correspondendo ao bem estar dos organismos,
303 ou seja, a homeostase (Skolova *et al.* 2004, Krysko *et al.* 2008, Kiss 2010).

304 Durante a apoptose, componentes intracelulares são capturados e eliminados.
305 Assim a morte programada de células danificadas desempenha um papel chave no
306 sistema imune, uma vez que evita danos inflamatório dos tecidos circundantes e protege
307 o hospedeiro contra a disseminação ou propagação de patógeno (Chen & Wang 2002,
308 Krysko *et al.* 2008).

309 Além disso, o processo de apoptose pode ser um indicador do estado do sistema
310 imune de invertebrados, pois fornece informações sobre o impacto de poluentes e
311 xenobióticos ambientais, facilitando a compreensão do estado de saúde dos organismos
312 (Danial & Korsmeyer 2004, Kurokawa & Kornbluth 2009, Kiss 2010) (Figura 3).

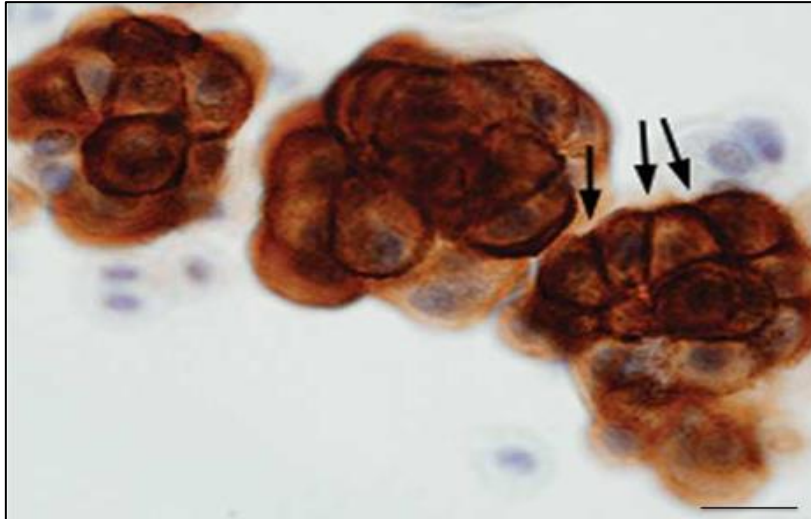


Figura 3 - Grupo de hemócitos em apoptose (setas). ApopTag Bar = 100 μ m.

313

314

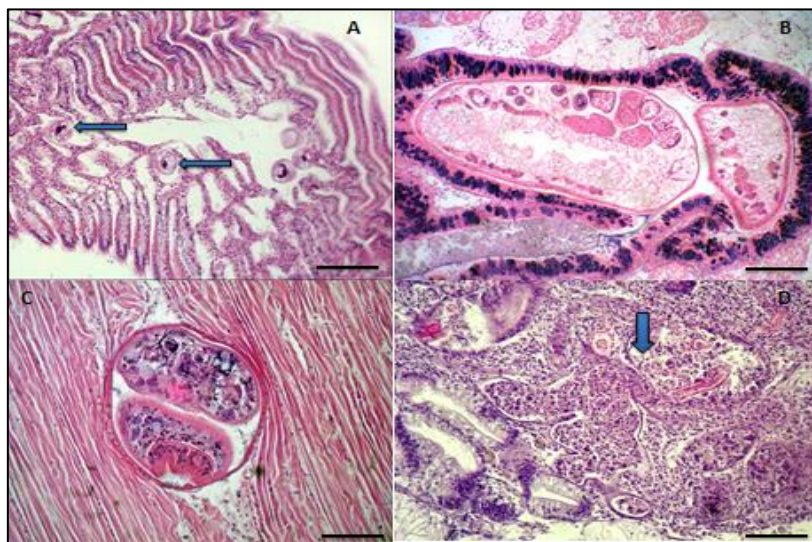
315 De modo geral, podem ser vistas na apoptose três tipos principais de alterações
316 bioquímicas 1) alterações na membrana e reconhecimento por parte das células
317 fagocíticas, 2) ativação das caspases e 3) ruptura do DNA e de outras proteínas (Kumar
318 *et al.* 2010). No início da apoptose tem expressão de fosfatidilserina nas camadas mais
319 externas da membrana celular, que fazem um "flipped out" das camadas mais internas.
320 Isso permite o reconhecimento precoce das células mortas por macrófagos, resultando
321 na fagocitose sem liberação de componentes celulares pró-inflamatórios (Hengartner *et*
322 *al.* 2003). Outra característica específica da apoptose é a ativação de um grupo de
323 enzimas que pertencem a uma família de proteases de cisteína, denominadas "caspases"
324 (Kumar *et al.* 2010). As caspases ativadas dividem muitas proteínas celulares vitais e
325 rompem o andaime e citoesqueleto nuclear. Também ativam as DNAses que degradam
326 o DNA nuclear. Embora as alterações bioquímicas expliquem em parte alguma das
327 alterações morfológicas de apoptose, é importante notar que a análise bioquímica da
328 fragmentação de DNA ou a ativação de caspase não deve ser utilizada para definir um
329 processo de apoptose, uma vez que pode ocorrer apoptose sem fragmentação
330 oligonucleosomal de DNA podendo ser caspase-independente (Lavrik *et al.* 2005).
331 Logo, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular propõe que as classificações das
332 modalidades de morte celular devem ser baseadas exclusivamente em critérios
333 morfológicos, uma vez que não existe uma clara equivalência entre as alterações
334 ultraestruturais e bioquímicas que resultam na morte celular (Galluzi *et al.* 2007).

335

336 **Histopatologia**

337 A histopatologia também é uma importante ferramenta empregada na
338 investigação do estado de saúde de moluscos bivalves, onde alterações histológicas
339 refletem possíveis danos teciduais, seja pela ação de microrganismos (Hine & Thorne
340 2002, Lohrmann 2009), seja pela presença de contaminantes (Dove & Sammut 2007),
341 ou por variações ambientais (Bignell *et al.* 2008).

342 As flutuações na temperatura e salinidade da água do ambiente não somente tem
343 demonstrado comprometer a atividade imunológica de bivalves, mas também têm sido
344 relacionadas com o aumento de cargas de parasitos e patógenos. Estes parasitos se
345 adéquam a tais variações ambientais em busca de êxito reprodutivo, aumentando assim,
346 sua sobrevivência (Matozzo *et al.* 2007, Skolova 2009, Carvalho *et al.* 2013b) (Figura
347 4).



348
349 **Figura 4** - Segundo Carvalho *et al.* (2013b). **A:** *Trichodina* sp. em brânquias (setas) H-E Bar = 100 μ m.
350 **B:** Turbellaria na glândula digestiva, H-E Bar = 50 μ m. **C:** Metacercárias no músculo do sifão. H-E Bar =
351 50 μ m. **D:** Esporocistos na glândula digestiva com abundante necrose (seta), H-E Bar = 100 μ m.

352 Portanto, o seguinte trabalho visa avaliar o estado imunológico do marisco
353 branco (*M. mactroides*), uma espécie nativa no litoral extremo sul do Rio Grande do
354 Sul, através de estudos sobre sistema imunológico propriamente dito como a
355 caracterização e diferenciação dos hemócitos e por fenômenos biológicos que intervêm
356 no mecanismo de defesa como o índice apoptótico. Por último a histopatologia
357 permitirá avaliar modificações tissulares secundárias a uma alteração na resposta imune.

358 Sendo assim, o conhecimento do estado imunológico de *M. mactroides* poderá
359 auxiliar na solução de possíveis problemas que possam ser enfrentados no cultivo dessa
360 espécie.

361 **Objetivos**

362 Avaliar o estado imunológico do marisco branco (*Mesodesma mactroides*)
363 coletados em diferentes áreas no litoral extremo sul do Rio Grande do Sul, durante
364 diferentes estações do ano, visando:

365 →Verificar a eficácia da resposta imune por meio da caracterização e contagem
366 dos hemócitos presentes na hemolinfa, de acordo com a sazonalidade (verão, outono,
367 inverno e primavera) e localização (áreas com diferentes influências ambientais e
368 antrópicas).

369 →Verificar o índice apoptótico, de acordo com a sazonalidade e localização.
370 Tomando este fenômeno biológico como mecanismo independente, porém de
371 importância para avaliar o estado deste sistema.

372 →Verificar por meio de histologia, alterações histopatológicas causadas por
373 parasitos ou por alterações ambientais sazonais que possam contribuir para
374 imunossupressão do marisco branco.

375 **Referências**

376 ALADAILEH S, SV NAIR, D BIRCH & DA RAFTOS. 2007. Sydney rock
377 oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. Journal of
378 Invertebrate Pathology, 96: 48-63.

379 ARANA LV. 1999. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para
380 formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. Florianópolis:
381 UFSC. 310 p.

382 BASTIDA RO, A ROUX, C BREMEC, M GERPE & M SORENSEN. 1991.
383 Estructura poblacional de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) durante el verano
384 de 1989 en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Frente Mari, 9A: 83-92.

385 BASTIDA RO, EN IENO, JP MARTIN & E MABRAGAÑA. 1996. The yellow
386 clam (*Mesodesma mactroides*): a case study of a coastal resource in risk from the
387 South-West Atlantic Ocean. Journal of Medical and Applied Malacology, 8: 165.

388 BIGNELL J, M DODGE, S FEIST, B LYONS, P MARTIN, N TAYLOR, D
389 STONE, L TRAVALENT & G STENTIFORD. 2008. Mussel histopathology: effects of
390 season, disease and species. *Aquatic Biology*, 2: 1-15

391 BERGONCI PEA. 2005. Aspectos da dinâmica populacional do marisco branco
392 *Mesodesma mactroides* Deshayé, 1854 (Mollusca Bivalvia) em praias arenosas exposta
393 do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Biociências, Pontifícia
394 Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

395 BETTI M, C CIACCI, LC LORUSSO, B CANONICO, T FALCIONI & G
396 GALLO. 2006. Effects of tumour necrosis factor α (TNF α) on *Mytilus* haemocytes: role
397 of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biology of the Cell*, 98:
398 233-244.

399 BIBBY R, S WIDDICOMBE, H PARRY, J SPICER & R PIPE. 2008. Effects of
400 ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic*
401 *Biology*, 2: 67-74.

402 BOULANGER N, P BULET & C LOWENBERGER. 2006. Antimicrobial
403 peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in*
404 *Parasitology*, 22: 262-268.

405 BRANDINI FP, AS SILVA & LAO PROENÇA. 2000. Oceanografia e
406 maricultura. In: VALENTI, WC, RC POLI, JA PEREIRA, JR BORGHETTI. (Eds.).
407 Aquicultura no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/
408 Ministério da ciência e tecnologia, p. 107-141.

409 CÁCERES-MARTÍNEZ J & R VÁSQUEZ-YEOMANS. 2008. La patología en
410 moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en
411 América Latina. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y
412 manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su
413 sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto
414 de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.
415 pp. 327–337.

416 CANESI L, C CIACCI, R FABBRI, A MARCOMINI, G POJANA & G
417 GALLO. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity.
418 *Marine Environmental Research*, 76: 16-21

419 CARVALHO YBM, LH POERSCH & LA ROMANO. 2013a. *Rickettsia*-
420 associated mortality of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Bivalvia:
421 Mesodesmatidae) in southern Brazil. *Malacologia*, 56(1-2): 301-3017.

422 CARVALHO YBM, LH POERSCH, JP JUNIOR & LA ROMANO. 2013b.
423 Histopathological survey of the yellow clam *Mesodesma mactroides* from southern
424 Brazil. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 33(2): 53-58.

425 CHEN M & J WANG. 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways.
426 Apoptosis, 7: 313-319.

427 CHENG TC & C COMBES.1990. Influence of environmental factors on the
428 invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe. In: Castri FD,
429 Hansen AJ, Debussche M, editors. Biological invasions in Europe and the
430 Mediterranean Basin. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; p. 307 e 332.

431 CHENG TC. 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy VS, Newell
432 RIE, Eble F, editors. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. College Park: Maryland
433 Sea Grant College; p. 299 e 333.

434 CIMA F, V MATOZZO, MG MARIN & L BALLARIN. 2000. Haemocytes of
435 the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional
436 characterisation. Fish & Shellfish Immunology, 10: 677-693.

437 COSCARÓN S. 1959. La almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*, Deshayes)
438 de la costa de la Provincia de Buenos Aires. Agro. Publ. Tec. v. 1, n. 3, p. 1-66.

439 COMESAÑA P, SM CASAS, A CAO, E ABOLLO, I ARZUL & B MORGA.
440 2012. Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks
441 with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.
442 Journal of Invertebrate Pathology, 109: 274-286.

443 CREMONTE F & A FIGUERAS. 2004. Parasites as possible cause of mass
444 mortalities of the critically endangered clam *Mesodesma mactroides* on the Atlantic
445 coast of Argentina. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24: 166–
446 171.

447 DANIAL NN & SJ KORSMEYER.2004. Cell death: critical control points.
448 Cell, 116: 205-219.

449 DANG C, T TAN, D MOFFIT, J D DEBOUTTEVILLE & AC BARNES. 2012.
450 Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: The Sydney rock
451 oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. Fish & Shellfish
452 Immunology, 33: 138-142.

453 DEFEO, O, V SCARABINO.1990. Ecological significance of a possible
454 deposit-feeding strategy in *Mesodesma mactroides* Deshayes, 1854 (Mollusca:
455 Pelecypoda). Atlântica, Rio Grande, v. 12, n. 1, p. 55-65.

456 DEFEO O. 1998. Testing hypotheses on recruitment, growth, and mortality in
457 exploited bivalves: an experimental perspective. In: Proceedings of the North Pacific
458 Symposium on Invertebrate Stock Assessment and Management. Canadian Journal of
459 Fisheries and Aquatic Sciences, Special Publication, Ottawa, v. 125, p. 257-254.

460 DEFEO O. 2003. Marine invertebrate fisheries in sandy beaches: an overview.
461 Journal of Coastal Research, Issue 35: 56-65.

462 DONAGHY L & AK VOLETY. 2011. Functional and metabolic
463 characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *in vitro* impacts of
464 temperature. Fish & Shellfish Immunology, 31: 808-814.

465 DOVE MC & J SAMMUT. 2007. Histological and feeding response of Sydney
466 rock oysters, *Saccostrea glomerata*, to acid sulfate soil outflows. Journal of Shellfish
467 Research, 26: 509–518.

468 ELLIS RP, H PARRY, JI SPICER, TH HUTCHINSON, RK PIPE & S
469 WIDDICOMBE. 2011. Immunological function in marine invertebrates: responses to
470 environmental perturbation. Fish & Shellfish Immunology, 30: 1209–1222.

471 FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and
472 challenges. Food and Agriculture Organization: Rome. 223 pp.

473 FIORI S & NJ CAZZANIGA. 1999. Mass mortality of the yellow clam,
474 *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mactracea) in Monte Hermoso beach, Argentina.
475 Biological Conservation, 89: 305-309.

476 FIORI S & O DEFEO. 2006. Biogeographic patters in life-history traits in the
477 yellow clam, *Mesodesma mactroides*, in sandy beaches of South America. Journal of
478 Coastal Research, 22(4): 872-880.

479 FISHER WS & RIE NEWELL. 1986. Salinity effects on the activity of granular
480 hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. Biological Bulletin of the
481 Marine Biological Laboratory, Woods Hole, 170: 122-134.

482 FONTANA CS, GA BENCKE & RE REIS. 2003. Livro vermelho da fauna
483 ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: EDIPUCRS, 632 p. il.

484 GALLOWAY TS & MH DEPLEDGE. 2001. Immunotoxicity in nvertebrates:
485 Measurament and Ecotoxicological Relevance. Ecotoxicology, 10:5-23.

486 GALLUZI L, MC MAIURI, I VITALE, H ZISCHKA, M CASTEDO, L
487 ZITVOGEL, G KROEMER. 2007. Cell death modalities: classification and
488 pathophysiological implications. Cell Death Differ, 14: 1237-1266.

489 GANS T. 2003. The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity.
490 Integrative and Comparative Biology, 43: 300–304.

491 GANZ T & RI LEHRER. 1995. Defensins. Pharmacology & Therapeutics, 66:
492 191–205.

493 GANZ T & RI LEHRER. 1997. Antimicrobial peptides of leukocytes. Current
494 Opinion in Hematology, 4: 53–58.

495 GIANUCA NM. 1975. Sobre un record de tamaño para *Mesodesma mactroides*
496 Deshayes, 1854 (Mollusca: Pelecypoda). Comunicaciones de la Sociedad Malacologica
497 del Uruguay, Montevideo, v. 4, n. 28, p.55-58.

498 GIANUCA NM. 1985. The ecology of a sandy beach in Southern Brazil. Tese
499 de Doutorado, não publicada, University of Southampton, Southampton, 330p.

500 GIL GM & JW THOMÉ. 1998. *Donax hanleyanus* Philippi, 1847 como
501 indicador ambiental. Biociências, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 189-193.

502 GOULLETQUER P, P SOLECHNIK, OLE MOINE, D RAZET, P GEAIRON,
503 N FAURY & S TAILLADE. 1998. Summer mortality of the cupped oyster *Crassostrea*
504 *gigas* in the bay of Marennes Oléron (France). ICES, Lisbon CM. CC (14): 14–20.

505 GUEGUEN Y, A HERPIN, A AUMELAS, J GARNIER, J FIEVET, J-M
506 ESCOUBAS, P BULET, M GONZALES, C LELONG, P FAVREL & E BACHÈRE.
507 2006. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*.
508 RECOMBINANT PRODUCTION, FOLDING, SOLUTION STRUCTURE,
509 ANTIMICROBIAL ACTIVITIES, AND GENE EXPRESSION. Journal of Biologic
510 Alchemistry 6: 313-323.

511 HENGARTNER MO. 2000. Apoptosis: corralling the corpses. Cell, 104: 325-
512 328.

513 HERRMANN M, JEF ALFAYA, ML LEPORE, PE PENCHASZADEH & WE
514 ARNTZ. 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam
515 *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy, temperate
516 beach in northern Argentina. Helgoland Marine Research, 65: 285–297.

517 HERRMANN M. 2009. Population dynamics of the surf clams *Donax*
518 *hanleyanus* and *Mesodesma mactroides* from open-Atlantic beaches off Argentina.
519 Reports on Polar and Marine Research, 585, 235p.

520 HINE PM. 1999. The inter-relationship of bivalve haemocytes Review. Fish &
521 Shellfish Immunology, 9: 367-385.

522 HOOKER SH. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand
523 pipi *Paphies australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). Bulletin of Marine Science, 61(2):
524 225-240.

525 HUGHES FM, B FOSTER, S GREWAL & IM SOKOLOVA. 2010. Apoptosis
526 as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus*
527 *marinus*. Fish & Shellfish Immunology, 29: 247-257.

528 KERR JFR, AH WYLLIE, AR CURRIE. 1972. Apoptosis: a basic biological
529 phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of
530 Cancer, 26: 239-257.

531 KISS T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. Apoptosis,
532 15: 313-321.

533 KRYSKO DV, TV BERGHE, K D'HERDE & P VANDENABEELE, 2008.
534 Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Methods, 44, 205-
535 221.

536 KUCHEL RP, S ALADAILEH, D BIRCH, N VELLA & DA RAFTOS. 2010.
537 Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster
538 (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology, 104: 97-104.

539 KUMAR V, AK ABBAS, N FAUSTO, JC ASTER. 2010. Robbins and Cotran:
540 pathologic basis of disease. 8 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 25-32.

541 KUROKAWA M & S KORNBLUTH. 2004. Caspases and kinases in a death
542 grip. Cell, 138: 838-854.

543 LAVRIK IN, A GOLKS, PH KRAMMER. 2005. Caspases: pharmacological
544 manipulation of cell death. The Journal of Clinical Investigation, 115: 2665-2672.

545 LOHRMANN KB. 2009. How healthy are cultivated scallops (*Argopecten*
546 *purpuratus*) from Chile? A histopathological survey. Revista de Biología Marina y
547 Oceanografía, 44 (1), pp. 35-47.

548 MAMAT ZN & AC ALVARO. 2014. Evaluation of microalgal and formulated
549 diets for the culture of the New Zealand pipi clam *Paphies australis*. International
550 Aquatic Research, 6: 2-13.

551 MANSUR MCD, RM VALER & NCM AIRES. 1994. Distribuição e
552 preferência ambientais dos moluscos bivalves no açude do parque de proteção
553 ambiental COPELUL, no município de Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil. Biociências,
554 Porto Alegre, v. 2, n. 1, p. 27-45.

555 MARINS LF & JA LEVY. 2000. Análise do fluxo gênico de *Mesodesma*
556 *mactroides* Deshayes, 1854 (BIVALVIA, MESODESMATIDAE) na zona costeira

557 adjacente à saída do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande – RS). Atlântica, Rio
558 Grande, v. 22, p. 13-26.

559 MARQUES CG. 2004. Aspectos reprodutivos do berbigão *Tivela mactroides*
560 (Born, 1778) (Bivalvia:Verenidae), na Enseada de Caraguatatuba, São Paulo – Brasil.
561 São João da Boa Vista, SP. 67p

562 MARSH J & JA GOODE. 1994. *Antimicrobial Peptides*, Ciba Foundation
563 Symposium 186 (Wiley, Chichester, UK).

564 MATOZZO V, M MONARI, J FOSCHI, GP SERRAZANETTI, O CATTANI
565 & MG MARIN. 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I.
566 alterations in immune responses. *Marine Biology*, 151: 1051-1058.

567 MATOZZO V, MG MARIN, F CIMA & L BALLARIN. 2008. First evidence of
568 cell division in circulating haemocytes from the manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell*
569 *Biology International*, 32: 865–868.

570 MAYRAND E, SD ST-JEAN & SC COURTENAY. 2005. Haemocyte
571 responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a
572 reference site: can the immune system recuperate? *Aquaculture Research*, 36: 962-971.

573 MÉNDEZ S. 1995. Bivalve mortality on southwest Atlantic shores. *Harmfull*
574 *Algae News*. 12: 10-11.

575 MONARI M, V MATOZZO, J FOSCHI, O CATTANI, GP SERRAZANETTI
576 & MG MARIN. 2007. Effects of high temperatures on functional responses of
577 haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 98-114.

578 MORET Y & P SCHMID-HEMPEL. 2000. *Science*. 290: 1166-1168.

579 MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura 2013. Boletim Estatístico da Pesca e
580 Aquicultura, Brasil 2011. Brasília, Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em:
581 <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%2](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)
582 [02011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)> Acesso em: 8 ago. 2014.

583 NARCHI W. 1981. Aspects of the morphology of *Mesodesma mactroides*
584 (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Malacologia*, Ann Arbor, v. 21, n. 1-2, p. 95-110.

585 ODEBRECHT C, L RÖRIG, VT GARCIA & PC ABREU. 1995. Shellfish
586 mortality and a red tide event in southern Brazil. In: LASSUS, P *et al* (eds.) *Harmful*
587 *marine algal blooms*. Lavoisier. Paris, 213–218.

588 OLIVIER SR. *et al*. 1971. Estructura de la comunidad, dinámica de la población
589 y biología de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides* Desh., 1854) en Mar Azul

590 (Pdo. de Gral. Madariaga, Bs. As., Argentina). Proy. Desarr. Pesq. FAO, Ser. Inf. Tecn.
591 Publ., Mar del Plata, v. 27, p. 1-90.

592 PERRIGAULT M, SF DAHL, EP ESPINOSA, L GAMBINO & B ALLAM.
593 2011. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and
594 QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters. Journal
595 of Invertebrate Pathology, 106: 322-332.

596 PIPE RK & JA COLES. 1995. Environmental contaminants influencing immune
597 function in marine bivalve molluscs. Fish & Shellfish Immunology, 5: 581-595.

598 RODRÍGUEZ J & GLE MOULLAC. 2000. State of the art of immunological
599 tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture, 191:109-119.

600 ROMERO A, N ESTÉVEZ-CALVAR, S DIOS, A FIGUERAS & B NOVOA.
601 2011. New Insights into the apoptotic process in Mollusks: characterization of caspase
602 genes in *Mytilus galloprovincialis*. PLoS One. 6 p. e 17003.

603 RIOS EC. 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio
604 Grande. 368p.

605 ROULSTON A, RC MARCELLUS & PE BRANTON. 1999. Viruses and
606 apoptosis. Annual Review of Microbiology, 53: 577-628.

607 SCHLEDER DD, M KAYSER, S SÜHNEL, J.F FERREIRA, G.S RUPP & M.A
608 BARRACO. 2008. Evaluation of hemato-immunological parameters during the
609 reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-
610 enriched diet. Aquaculture, 280: 256-263.

611 SOKOLOVA IM. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. Invertebrate
612 Survival Journal. 6: 49-58.

613 SOKOLOVA IM, S EVANS & FM HUGHES. 2004. Cadmium-induced
614 apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no
615 mitochondrial permeability transition. The Journal of Experimental Biology, 207: 3369-
616 3380.

617 SOUZA FILHO J, D HERZOG & CE FRANKEN. 2004. Custo de produção do
618 mexilhão cultivado. Cadernos de indicadores agrícolas-4. Florianópolis, Instituto
619 Cepa/SC.

620 URBAN HJ. 2000. Culture potential of the Caribbean pearl oyster (*Pinctada*
621 *imbricata*) from the Caribbean. II. Spat collection, growth and mortality in culture
622 systems. Aquaculture, v. 189, p. 375-388.

623 URIARTE I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En
624 A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos
625 bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América
626 Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt,
627 Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO, pp. 61–75.

628 VARGAS-ALBORES F & M.A BARRACCO. 2001. Mecanismos de Defensa
629 de los Moluscos Bivalvos. In: *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica*; Ciencia y
630 Acuicultura. MAEDA-MARTINEZ, A. N. (ed). Editorial Limusa, México, 7: 127-146.

631 ZASLOFF M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*,
632 vol. 415, no. 6870, p. 389-395.

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

Artigo em Anexo.

653

654

655

656

657

658

659

660

661

**Perfil imunológico do marisco branco *Mesodesma*
mactroides (MESODESMADIDAE) do litoral sul do Rio Grande do Sul**

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

*Esse artigo será submetido para **International Journal of Malacology**.

679 **Perfil imunológico do marisco branco *Mesodesma mactroides***
680 **(MESODESMATIDAE) do litoral sul do Rio Grande do Sul**

681 Juan Jethro Silva Santos¹; Yuri Bovi Carvalho¹; Diogo Luiz de Alcantara Lopes²; Luis
682 Alberto Romano^{1*}

683 ¹Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Rio
684 Grande – FURG, CP 474, Rio Grande, RS, 96201-900, Brasil.

685 ²Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande
686 – FURG, CP 474, Rio Grande, RS, 96201-900, Brasil.

687

688 *Correspondente: Luis Alberto Romano

689 e-mail: dcluis@yahoo.com

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707 **Resumo**

708 O marisco branco, *Mesodesma mactroides* (Mesodesmatidae) é um bivalve de
709 areia que se distribui desde o Rio de Janeiro, Brasil até o sul da Província de Buenos
710 Aires, Argentina, e suas populações vêm desaparecendo nas últimas décadas. No intuito
711 de ampliar o conhecimento sobre esta espécie, o objetivo do presente trabalho foi
712 avaliar o estado imunológico do marisco branco (*M. mactroides*) coletados em
713 diferentes áreas (Molhes da Barra (32°09'S 52°06'O), Estação Marinha de Aquicultura-
714 EMA (32°12'S 52°10'O), Navio Altair (32°30'S 52°22' O), Farol de Sarita (32°37'S
715 52°25'O), Farol do Albardão (33°44'S 53°22'O) e Molhes da Barra-Chuí (33°44'S
716 53°22'O)) e estações do ano (verão, outono, inverno e primavera). Foram realizadas a
717 caracterização e a determinação da Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH),
718 determinação do índice apoptótico e determinação da incidência de parasitos através de
719 análises histológicas. Dois tipos de hemócitos foram identificados (hialinos-HH e
720 granulares-HG). Na CDH, tanto HH, quanto HG apresentaram variações significativas,
721 entre os pontos, no período do verão e inverno. O índice apoptótico mostrou variação
722 significativa apenas no verão. Nas análises histopatológicas não se observou diferenças
723 entre os diferentes pontos de amostragem. Os resultados deste trabalho demonstraram
724 que ações antropogênicas associadas a variações ambientais (temperatura e salinidade)
725 podem estar afetando o sistema imune do *M. Mactroides*, porém, mais estudos precisam
726 ser realizados para determinar a real influência desses fatores sobre o sistema imune e
727 assim, contribuir com um futuro manejo e a malacocultura dessa espécie.

728

729 Palavras - chave: *Mesodesma mactroides*, hemócitos, antropogênicas, malacocultura.

730

731

732

733

734

735

736

737

738 1 Introdução

739 Com o aumento da demanda e da produção globalizada, a América latina está
740 investindo em cultivo de espécies valiosas de bivalves, como a ostra do pacífico
741 *Crassostrea gigas* e o mexilhão azul *Mytilus galloprovincialis*, além de espécies nativas
742 como os mexilhões, *Mytilus chilensis* e *Perna perna* e vieiras, *Nodipecten nodosus*
743 (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2008, MPA 2013). Neste sentido à
744 diversificação de cultivos de espécies com importância socioeconômica e potenciais
745 futuros (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2008) faz-se necessária.

746 Neste contexto, a família Mesodesmatidae, representada por moluscos de areia
747 que apresentam importância socioeconômica e ambiental em diversas regiões do
748 mundo, vem sendo apontadas como promissoras para aquicultura. Como é o caso das
749 espécies nativas, “toheroa” *Paphies ventricosa* e “pipi” *Paphies australis* na Nova
750 Zelândia (Hooker 1997) e da “macha” *Mesodesma donacium* no Chile e Peru (Uriarte
751 2008).

752 O marisco branco *Mesodesma mactroides* (Mesodesmatidae) é um espécie
753 nativa que se distribui desde a Ilha Grande, RJ (23°8'26"S 44° 14'50" O) até o sul da
754 Província de Buenos Aires (36°9'26" 60°34'11"O) (Rios 1994), e que por várias
755 décadas vem sendo alvo de estudos (Herrmann *et al.* 2011). Essa espécie, destaca-se
756 tanto pela sua densidade populacional e tamanho (Oliver *et al.* 1971) quanto por possuir
757 um valor histórico como recurso pesqueiro (Coscarón 1959).

758 Atualmente a população de *M. mactroides* encontra-se drasticamente reduzida
759 devido à exploração e extrações ilegais ocorridas durante várias décadas (Bastida *et al.*
760 1996, Herrmann 2009) e a mortalidades massivas que praticamente dizimaram seus
761 principais estoques populacionais. A mortalidade massiva desta espécie pode estar
762 relacionadas à ação de algas tóxicas (Odebrecht *et al.* 1995) e parasitos (Cremonte &
763 Figueiras 2004, Carvalho *et al.* 2013a). Porém a real causa ainda permanece
764 desconhecida.

765 Dessa forma, para tentar entender e explicar melhor esse fenômeno, vários
766 estudos, utilizando como ferramenta o conhecimento sobre sistema imunológico, vem
767 sendo realizados, relacionando principalmente estresses bióticos e abióticos à resposta
768 imune dos organismos (Goulletquer *et al.* 1998, Gagnaire *et al.* 2006, Donaghy &
769 Volety 2011, Perrigault *et al.* 2011, Canesi *et al.* 2012).

770 Em moluscos bivalves, o sistema imunológico, possui mecanismos de defesas
771 que envolvem reações celulares desempenhadas por células circulantes na hemolinfa,
772 denominadas hemócitos (Betti *et al.* 2006) e reações humorais, onde encontra-se as
773 proteínas e outras moléculas dissolvidas no plasma que atuam contra doenças e
774 parasitas (Vargas-Albores & Barraco 2001) buscando a homeostase do organismo.

775 Comumente é relatada a ocorrência de dois grupos básicos de hemócitos em
776 bivalves, os granulares e hialinos (Vargas-Albores & Barraco 2001), que constituem
777 uma das principais linhas de defesa contra partículas invasoras e estão envolvidos na
778 fagocitose e no encapsulamento de material estranho (Hégaret *et al.* 2003) além de
779 participar de funções fisiológicas (Donaghy *et al.* 2009) que incluem transporte,
780 distribuição e digestão de nutrientes (Beninger *et al.* 2003), reparo da concha e tecidos
781 (Mount *et al.* 2004) e processos de desintoxicação (Fisher 2004).

782 Os hemócitos têm sido utilizados para avaliar o estado do sistema imune e
783 indiretamente o estado de saúde em muitas espécies de bivalves (Donaghy & Volety
784 2011, Perrigault *et al.* 2011, Canesi *et al.* 2012), assim como a apoptose, que é um
785 processo natural denominado morte celular programada.

786 A apoptose é um fenômeno biológico, não pertencendo ao sistema imune
787 propriamente dito, mas que auxiliam biologicamente o sistema em várias circunstâncias,
788 como por exemplo no controle de infecções virais (Roulston *et al.* 1999). Quando um
789 vírus entra na célula, esta entra em apoptose como um mecanismo de “suicídio
790 altruísta”, ou seja, a célula morre antes que o vírus se replique, impedindo sua
791 propagação (Romero *et al.* 2011). Desta forma, avaliar a quantidade de hemócitos que
792 estão em apoptose, através do índice apoptótico, indica a capacidade de resistência a
793 infecções virais, processo importante para compreender o estado de saúde da espécie em
794 questão (Sokolova 2009, Hughes *et al.* 2010).

795 O conhecimento sobre histopatologia, também é uma importante ferramenta
796 empregada na investigação do estado de saúde de moluscos bivalves e que pode auxiliar
797 na detecção de problemas e ou alterações fisiológicas (Bignell *et al.* 2008). Neste
798 sentido, alterações histológicas refletem possíveis danos teciduais, seja pela ação
799 parasitária (Lohrmann 2009), ou por variações ambientais (Bignell *et al.* 2008).

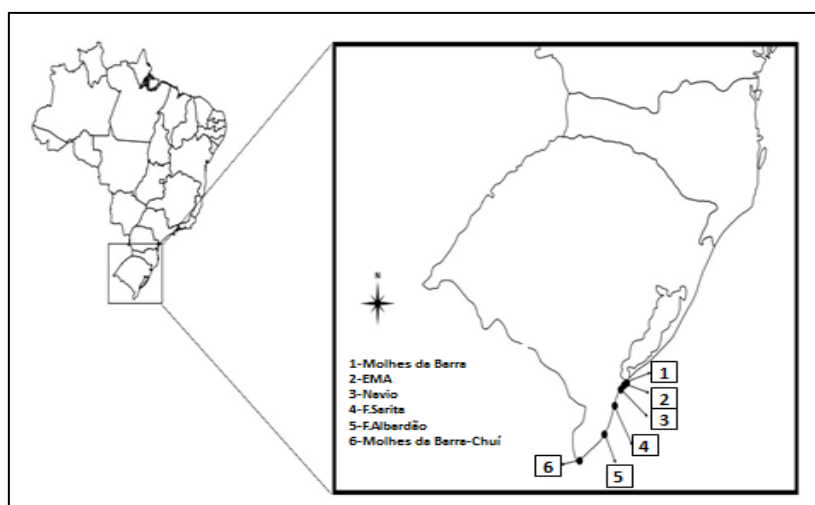
800 Logo, tais informações podem auxiliar na determinação do estado imunológico
801 de espécies nativas de bivalves, servindo de base para avaliações posteriores da
802 biologia, crescimento e sobrevivência em condições laboratoriais (Urban 2000).

803 Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o estado imunológico do
804 marisco branco (*Mesodesma mactroides*) coletado em diferentes áreas e estações do
805 ano, no litoral extremo sul do Rio Grande do Sul, buscando compreender o seu
806 desaparecimento nesta região e contribuir para o desenvolvimento do cultivo desta
807 espécie.

808 2 Material e Métodos

809 2.1 Área de estudo

810 Os bivalves, *Mesodesma mactroides*, foram coletados de Fevereiro à Dezembro
811 de 2013 (verão, outono, inverno e primavera), durante as marés baixas e ao longo da
812 zona de entremarés da praia do Cassino. Ao total, seis pontos de coletas com diferentes
813 influências antrópicas foram utilizados: Molhes da Barra (32°09'S 52°06'O), Estação
814 Marinha de Aquicultura-EMA (32°12'S 52°10'O), Navio Altair (32°30'S 52°22' O),
815 Farol de Sarita (32°37'S 52°25'O), Farol do Albardão (33°44'S 53°22'O) e Molhes da
816 Barra-Chuí (33°44'S 53°22'O), Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 1).



817

818 **Figura 1** - Pontos de coleta Molhes da Barra (1), EMA (2), Navio (3), Farol de Sarita (4), Farol do
819 Albardão (5) e Molhes da Barra - Chuí (6).

820 2.2 Procedimentos de coleta

821 2.2.1 Amostragem dos bivalves

822 Nos pontos anteriormente mencionados foram realizadas duas coletas (20
823 indivíduos por ponto em cada coleta) na estação de outono, inverno e primavera. Já na
824 estação do verão apenas uma coleta foi realizada (Fevereiro), devido à presença maciça

825 humana e de veículos nas praias nesta época. Utilizou-se pá de corte para desenterrar os
826 espécimes coletados.

827 No momento da coleta do material biológico registraram-se os dados ambientais
828 como, temperatura da água (termômetro de mercúrio) e salinidade (refratômetro). Após
829 a coleta os mariscos foram mantidos vivos e armazenados em caixas térmicas (10L),
830 com a água marinha na mesma salinidade e temperatura do ambiente, até serem
831 transportados ao laboratório. No laboratório, os bivalves, foram mantidos por um dia em
832 caixas d'águas com aeração constante e água do mar, para as análises posteriores.

833 **2.2.2 Procedimentos em laboratório**

834 **2.2.2.1 Medidas do comprimento total da concha e peso total**

835 A determinação do comprimento total (Lt) (a maior distância entre os bordos da
836 concha em linha paralela ao umbo) foi realizada com o auxílio de um paquímetro
837 manual (0,1 mm de precisão). O peso total (Pt) (que inclui peso da concha, peso fresco
838 da carne mais umidade) dos animais mediu-se com o auxílio de uma balança de precisão
839 (Marte modelo BL3200H, 0,01g de precisão). A relação comprimento total da concha e
840 peso total serviu para analisar previamente as dimensões dos organismos capturados
841 sazonalmente e nos diferentes pontos amostrais.

842 **2.2.2.2 Estudo do sistema imunológico *M. mactroides***

843 A caracterização e a contagem diferencial de hemócitos foram realizadas
844 retirando a hemolinfa de 10 exemplares (dos 20 coletados) de bivalves por ponto
845 (comprimento total $\geq 2,00$ cm). A hemolinfa foi retirada da cavidade pericardial, para
846 montagem das lâminas de esfregaços, a qual foi fixada em metanol, por 20 minutos e
847 posteriormente corada com Giemsa 20 % durante 10 minutos.

848 Para determinar a porcentagem de hemócitos em apoptose 10 exemplares (dos
849 20 coletados) foram utilizados (comprimento total $\geq 2,00$ cm). Para isso esfregaços de
850 hemolinfa foram realizados em lâminas positivadas, sem fixá-las. A determinação da
851 quantidade de hemócitos em apoptose foi realizada utilizando-se o kit ApopTag®
852 Peroxidase In situ (Millipore) "TUNEL REACTION", de acordo com Charriaut-
853 Marlangue & Ben-Ari (1995).

854

855

856 **2.2.2.3 Análise histológica**

857 Os tecidos de 10 exemplares (dentre os 20 utilizados para análises anteriores)
858 por ponto de coleta foram fixados em solução salina de Davidson. As amostras foram
859 processadas no processador automático de tecidos LUPE PT 05 com inclusão em
860 Paraplast (Sigma). Após o emblocamento, os blocos foram cortados a 4 μ m no
861 micrótomo LUPETEC MRPO3 e corados com hematoxilina-eosina. Examinaram-se as
862 lâminas histológicas para determinar a presença e quantidades de parasitos e alterações
863 patológicas.

864 **2.2.2.4 Análises morfométricas**

865 A quantificação e diferenciação de hemócitos hialinos e granulares, das células
866 apoptóticas e dos números de parasitos realizou-se em ocular de integração de 5 linhas e
867 25 pontos (Carls Zeiss) segundo Weibel (1980).

868 **3. Análise estatística**

869 A análise estatística não paramétrica, (Kruskal-Wallis) foi realizada para
870 determinar as diferenças estatísticas entre os parâmetros avaliados (intervalo de
871 confiança de 95%). Valores em porcentagem, contagem diferencial de hemócitos
872 (hialinos e granulares) e índice apoptótico foram transformados para arcoseno da raiz
873 quadrada antes da realização do teste, porém os resultados encontram-se em sua forma
874 original.

875 **4. Resultados**

876 **4.1 Parâmetros físico e químico**

877 As médias da temperatura da água por pontos de coletas foram: primavera
878 (22,3°C \pm 1,44), verão (24,3°C \pm 1,51), outono (20,2°C \pm 0,84) e inverno (13,41°C \pm 0,62). O
879 parametro de temperatura da água variou entre médias máximas no verão de
880 26,0°C \pm 1,51 (Navio e Farol de Sarita) e médias mínimas no inverno de 12,9°C \pm 0,62
881 (Navio e Molhes da Barra-Chuí) (Tabela 1).

882 As médias da salinidade da água por pontos de coletas foram: primavera
883 (26,4 \pm 5,57), verão (30,3 \pm 0,51), outono (30,7 \pm 0,52) e inverno (27,9 \pm 1,14). O parâmetro
884 de salinidade variou entre médias máximas de 30 \pm 0,52 e 31 \pm 0,52, principalmente no

885 verão e outono (todos os pontos), e médias mínimas de $21\pm 5,57$ (EMA) e $18,5\pm 5,57$
 886 (Molhes da Barra) na primavera (Tabela 1).

887 4.2 Biometria

888 O comprimento total (Lt) e peso total (Pt) dos organismos coletados em
 889 diferentes pontos e estações estão apresentados na Tabela 1.

890 Os valores médios encontrados para o comprimento total dos organismos
 891 coletados variam entre máxima de $6,64\pm 0,86$ cm no verão e mínima de $1,20\pm 0,19$ cm no
 892 inverno, ambos observados no Farol de Albardão. Enquanto que os valores médios do
 893 peso total variaram entre máximas de $18,79\pm 6,21$ g e $29,42\pm 9,93$ g no verão
 894 respectivamente nos faróis de Sarita e Albardão e mínimo de $0,26\pm 0,10$ g no inverno
 895 (Farol do Albardão) e $0,51\pm 0,39$ g na primavera (Molhes da Barra). A ausência de
 896 dados do Lt e Pt nos Molhes da Barra e Farol do Albardão (outono) foi proveniente a
 897 falta de organismos nos pontos de coleta.

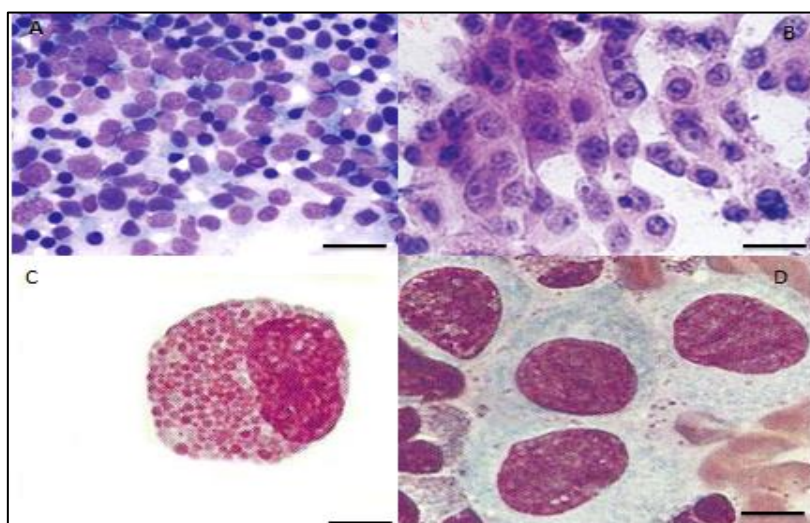
898 **Tabela 1** - Valores médios (\pm desvio padrão) da temperatura (T °C) e salinidade (S), além das médias do
 899 comprimento total (Lt) e peso total (Pt).

Períodos	Pontos	T (°C)	S	Lt (cm)	Pt (g)
VERÃO	M.BARRA	23,0	31,0	$3,36\pm 0,23$	$2,95\pm 0,62$
	EMA	23,0	31,0	$3,93\pm 0,93$	$5,60\pm 4,41$
	NAVIO	26,0	30,0	$4,43\pm 0,81$	$8,93\pm 6,41$
	F.SARITA	26,0	30,0	$6,19\pm 0,54$	$18,79\pm 6,21$
	F.ALBADÃO	25,0	30,0	$6,64\pm 0,86$	$29,42\pm 9,93$
	CHUÍ	23,0	30,0	$4,25\pm 0,18$	$6,53\pm 1,00$
OUTONO	M.BARRA	21,0	30,0		
	EMA	21,0	30,0	$3,56\pm 0,34$	$3,68\pm 0,96$
	NAVIO	20,0	31,0	$4,58\pm 0,99$	$9,40\pm 7,39$
	F.SARITA	20,0	31,0	$5,00\pm 1,94$	$12,37\pm 7,92$
	F.ALBADÃO	20,0	31,0		
	CHUÍ	19,0	31,0	$4,59\pm 1,19$	$9,76\pm 9,26$
INVERNO	M.BARRA	13,3	28,3	$1,81\pm 0,92$	$0,83\pm 1,43$
	EMA	13,0	27,3	$2,36\pm 1,71$	$3,05\pm 4,62$
	NAVIO	12,9	28,0	$2,28\pm 1,62$	$2,65\pm 3,80$
	F.SARITA	13,9	27,0	$1,50\pm 1,64$	$2,28\pm 7,09$
	F.ALBADÃO	14,4	27,0	$1,20\pm 0,19$	$0,26\pm 0,10$
	CHUÍ	12,9	30,0	$1,79\pm 0,99$	$1,38\pm 3,31$
PRIMAVERA	M.BARRA	24,0	18,5	$1,72\pm 0,34$	$0,51\pm 0,39$
	EMA	23,5	21,0	$2,30\pm 0,64$	$1,41\pm 0,89$
	NAVIO	22,0	26,0	$2,49\pm 0,68$	$1,45\pm 0,49$
	F.SARITA	22,5	31,0	$2,81\pm 0,77$	$2,46\pm 2,99$
	F.ALBADÃO	21,5	31,0	$1,77\pm 0,25$	$0,59\pm 0,25$
	CHUÍ	20,0	31,0	$1,78\pm 0,28$	$0,61\pm 0,24$

900 4.3 Caracterizações de hemócitos

901 Nos *M. mactroides* foram encontrados dois tipos de hemócitos, os granulares e
 902 os hialinos. Os hemócitos hialinos são redondos ou ovais, medindo entre 8 a 12

903 micrometros (μm) de diâmetros (com uma média de $9,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$) tem um núcleo grande
904 geralmente central, onde se observa nitidamente a diferença entre a eucromatina e
905 heterocromatina, e o citoplasma é abundante, homogêneo e sem grânulos. Já os
906 hemócitos granulares são de forma irregular, medindo entre 6 a 8 micrômetros (μm) de
907 diâmetros (com uma média de $7,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$), geralmente se encontram agrupados e tem
908 um núcleo no extremo das células. Este núcleo é homogêneo não sendo diferenciada a
909 eucromatina da heterocromatina. O citoplasma é abundante com grânulos e em alguns
910 casos observam-se vacúolos por fagocitose (Figura 2).



911

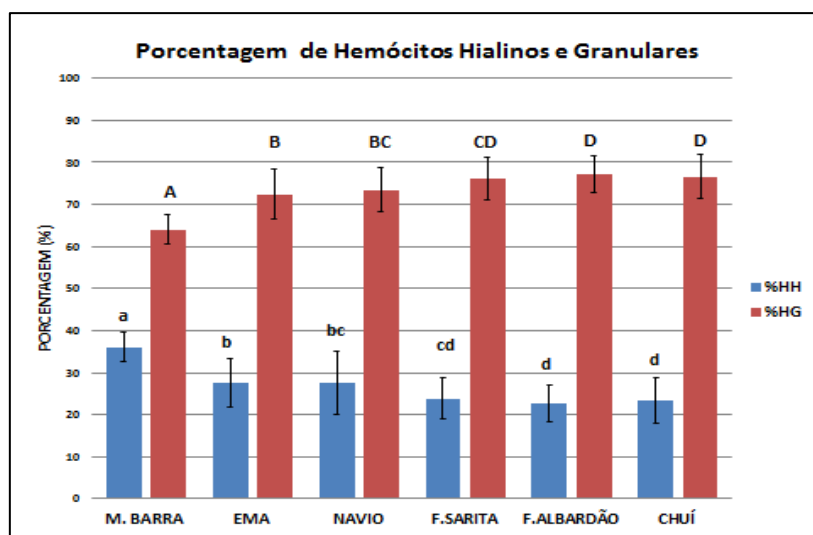
912 **Figura 2 - A:** Hemócitos de *M. mactroides* com população mista, composta por hemócitos granulares e
913 hialinos, Giemsa Bar = 50 μm . **B:** Hemócitos agrupados com componentes granulares e hialinos, Giemsa
914 Bar = 70 μm . **C:** Hemócitos granulares com abundantes grânulos no citoplasma, no núcleo e periferia
915 celular, Giemsa Bar = 150 μm .

916 4.4 Contagem diferencial de hemócitos (CDH)

917 A contagem diferencial de hemócitos (CDH), apresentada como porcentagem de
918 hemócitos hialinos e granulares, apresentou diferenças significativas quando levado em
919 consideração apenas os pontos de coletas e não as estações do ano (Figura 3).

920 Quando a CDH foi analisada levando em consideração as estações do ano,
921 diferenças significativas foram observadas apenas no verão e no inverno (Tabela 2). A
922 ausência de dados tanto nos Molhes da Barra (primavera, outono e inverno) e Farol do
923 Albardão (outono e inverno) foram proveniente da falta de organismos nos pontos de
924 coleta ou quando encontrados, o tamanho dos mesmos era inadequado para a coleta da
925 hemolinfa da cavidade pericardial (comprimento total menor que 2,00 cm).

926



927

928 **Figura 3** - Porcentagem de hemócitos hialinos (HH) e granulares (HG) dos diferentes grupos de mariscos
 929 brancos coletados em diferentes pontos, sem levar em consideração as estações do ano. As barras
 930 representam porcentagens médias (\pm desvio padrão). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças
 931 significativas na porcentagem do HG e letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na
 932 porcentagem do HH entre os grupos ($p < 0,05$).
 933
 934
 935
 936

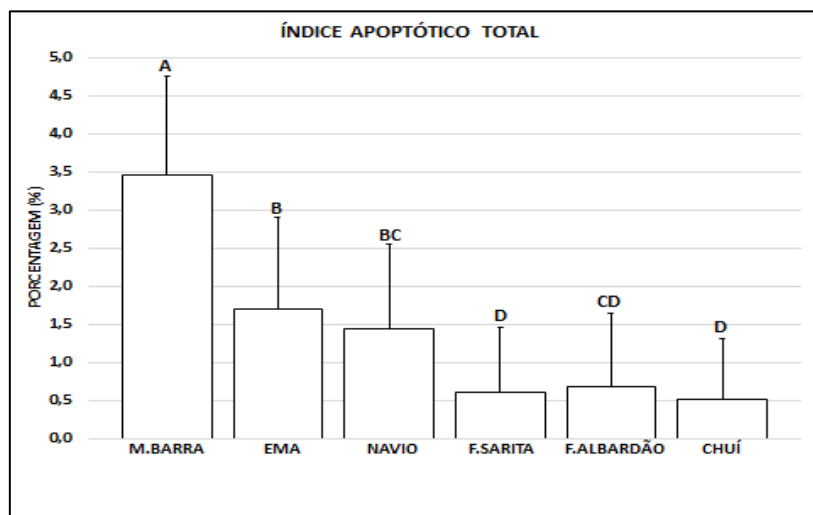
937 **Tabela 2** - Porcentagem média de hemócitos hialinos (HH), granulares (HG) e índice apoptótico (\pm
 938 desvio padrão) em diferentes grupos de mariscos brancos coletados em diferentes pontos e estações do
 939 ano. Letras diferentes na vertical representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Períodos	Pontos	HH (%)	HG (%)	Apoptose
VERÃO	M.BARRA	36,06 \pm 3,58 ^a	63,94 \pm 3,58 ^a	3,45 \pm 1,29 ^a
	EMA	27,20 \pm 6,93 ^{bc}	72,80 \pm 6,93 ^{bc}	1,83 \pm 1,11 ^{ab}
	NAVIO	28,60 \pm 5,03 ^{ab}	71,40 \pm 5,03 ^{ab}	1,82 \pm 0,98 ^{ab}
	F.SARITA	24,27 \pm 4,11 ^{bc}	75,73 \pm 4,11 ^{bc}	0,40 \pm 0,70 ^b
	F.ALBARDÃO	21,47 \pm 3,58 ^{bc}	78,53 \pm 3,58 ^{bc}	0,45 \pm 0,82 ^b
	CHUÍ	19,73 \pm 3,69 ^c	80,27 \pm 3,69 ^c	0,42 \pm 0,79 ^b
OUTONO	M.BARRA			
	EMA	28,17 \pm 6,12	71,83 \pm 6,12	1,30 \pm 1,22
	NAVIO	26,00 \pm 6,12	74,00 \pm 6,12	1,29 \pm 1,22
	F.SARITA	24,47 \pm 6,37	75,53 \pm 6,37	0,50 \pm 0,85
	F.ALBARDÃO			
	CHUÍ	25,07 \pm 5,43	74,93 \pm 5,43	0,42 \pm 0,67
INVERNO	M.BARRA			
	EMA	29,60 \pm 4,67 ^a	70,40 \pm 4,67 ^a	2,00 \pm 1,10
	NAVIO	30,60 \pm 4,23 ^{ab}	69,40 \pm 4,23 ^{ab}	1,25 \pm 1,14
	F.SARITA	23,40 \pm 5,10 ^b	76,60 \pm 5,10 ^b	0,82 \pm 1,08
	F.ALBARDÃO			
	CHUÍ	23,60 \pm 5,43 ^b	76,40 \pm 5,43 ^b	0,67 \pm 0,67
PRIMAVERA	M.BARRA			
	EMA	25,00 \pm 4,52	75,00 \pm 4,52	1,64 \pm 1,32
	NAVIO	25,43 \pm 5,84	74,57 \pm 5,84	1,38 \pm 1,02
	F.SARITA	23,33 \pm 4,13	76,67 \pm 4,13	0,73 \pm 0,79
	F.ALBARDÃO	24,00 \pm 4,69	76,00 \pm 4,69	0,90 \pm 1,10
	CHUÍ	24,67 \pm 5,60	75,33 \pm 5,60	0,60 \pm 0,84

940

941 4.5 Índice apoptótico

942 O índice apoptótico expresso em porcentagem apresentou diferenças
943 significativas quando levando em consideração os pontos de coletas, mas não as
944 estações do ano conforme, representada na Figura 4.



945

946 **Figura 4** - Índice apoptótico dos diferentes grupos de mariscos brancos coletados em diferentes
947 pontos, sem levar em consideração as estações do ano. As barras representam porcentagens médias (\pm
948 desvio padrão). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

949 Quando os dados do Índice apoptótico foram analisados levando em
950 consideração as estações do ano, diferenças estatísticas significativas foram observadas
951 apenas na estação do verão (Tabela 2).

952 4.6 Histopatologia

953 Nas análises histológicas realizadas nos mariscos brancos de diferentes pontos e
954 estações, não foram verificados danos teciduais associados a uma deficiência do sistema
955 imune. Observou-se a ocorrência de: *Trichodina* sp., protozoário ciliado que se localiza
956 nas brânquias dos hospedeiros e Turbelários, vermes que se localizam na luz do
957 intestino.

958 Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na ocorrência de
959 *Trichodina* sp. e turbelários entre os pontos analisados, Molhes da Barra, EMA, Navio,
960 Farol de Sarita, Farol do Albardão e Molhes da Barra-Chuí, sendo os respectivos
961 valores médios (\pm desvio padrão) de $0,01 \pm 0,15$; $0,04 \pm 0,27$; $0,01 \pm 0,09$; $0,03 \pm 0,24$;
962 $0,03 \pm 0,025$; $0,02 \pm 0,02$ para *Trichodina* sp. e de $0,01 \pm 0,06$; $0,01 \pm 0,10$; $0,08 \pm 0,42$;
963 $0,01 \pm 0,08$; $0,09 \pm 0,46$; $0,01 \pm 0,11$ para Turbelários.

964 5 Discussão

965 O desaparecimento do marisco branco já foi associado a várias causas como a
966 presença de algas tóxicas (Odebrecht *et al.* 1995, Fiori & Cazzaniga 1999) ou parasitos
967 (Cremonte & Figueras 2004), e recentemente se observou um surto de mortalidade
968 provocado por bactérias do gênero *Rickettsia* no litoral sul do Rio Grande do Sul, Brasil
969 (Carvalho *et al.* 2013b).

970 Neste contexto, estabelecer o estado da capacidade de resposta imune desta
971 espécie é de suma importância. Estudos tem demonstrado que o mecanismo de defesas
972 de bivalves é suscetível a mudanças ambientais, tais como temperatura, salinidade,
973 estresse antrópico e poluentes (Pipe & Cole 1995, Monari *et al.* 2007). Assim, o
974 conhecimento sobre hemogramas de bivalves são um dos principais parâmetros
975 utilizados para avaliar a condição do sistema imune e indiretamente o estado de saúde
976 dos mesmos, quando expostos a estresse ambiental e físico (Gagnaire *et al.* 2006,
977 Malagoli *et al.* 2007). Porém, até o presente momento, estudos específicos avaliando o
978 sistema imune de *M. mactroides*, ainda são totalmente desconhecidos.

979 Neste sentido, o presente estudo iniciou-se com a identificação, caracterização e
980 diferenciação dos hemócitos da hemolinfa de *M. mactroides*, principais componentes da
981 resposta imune. A caracterização dos hemócitos foi realizada, apesar de alguns autores
982 manifestarem dificuldades ao caracterizá-los em moluscos bivalves (Bauchau 1981).
983 Tais características, estruturais, mostraram-se semelhantes (hemócitos hialinos e
984 granulares) a de outras espécies como, *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.* 1997)
985 e *Nodipecten nodosus* (Schleder *et al.* 2008).

986 Os diferentes pontos de coletas analisados apresentam características diferentes
987 na morfodinâmica e sedimentologia de praia, como observado nos pontos localizados
988 próximos à desembocadura da laguna dos Patos (Calliari & Klein 1993), além de
989 diferentes exposições antrópicas (pisoteio humano e exploração), fatores que afetam a
990 distribuição da espécie *M. mactroides* (Bergonci & Thomé 2008). Por exemplo, o
991 Cassino é um distrito turístico da cidade de Rio Grande - RS, com 30.000 habitantes
992 permanentes e 150.000 turistas que chegam ao período do verão (por conta da praia).
993 Sendo importante mencionar que é permitida a entrada de carros dos visitantes na praia
994 (Secretaria do Turismo, Esporte e Lazer do RS 2014). Logo tais variações no ambiente
995 permite se discutir as alterações do sistema imune do da espécie *M. mactroides* e suas
996 possíveis causas.

997 Na contagem diferencial de hemócitos (CDH) a proporção de hemócitos
998 granulares (HG) de *M. mactroides* foi sempre superior a de hemócitos hialinos (HH) em
999 todos os grupos analisados. Os HG são as células mais imunocompetentes da hemolinfa
1000 dos bivalves (Vargas-Albores & Barraco 2001). A presença ou alteração dos seus
1001 valores torna-se um bom indicativo de saúde da espécie.

1002 Quando os dados da CDH dos diferentes grupos de mariscos brancos coletados
1003 em diferentes pontos, sem levar em consideração as estações do ano foram comparados
1004 entre si (Figura 3), observou-se a diminuição de HG nos locais com maior ação
1005 antropogênica, o que nos leva a crer que o impacto causado pelo aumento do fluxo de
1006 turistas desde os Molhes da Barra (32°09'S 52°06'O) ao Navio Altair (32°30'S 52°22'
1007 O) tenha contribuído para redução do estado imunológico do *M. mactroides*.
1008 Perturbações antrópicas, de fato, modulam o estado sanitário e posteriormente o sistema
1009 imune de moluscos (Mydlarz *et al.* 2006). Alguns autores acreditam que houve um
1010 aumento de doenças no ecossistema marinho como resultado de uma variedade de
1011 fatores antropogênicos (Harvell *et al.* 2002, Lafferty *et al.* 2004, Ward & Lafferty
1012 2004), que em alguns casos levaram a mudanças na prevalência, distribuição geográfica
1013 e perda de indivíduos.

1014 Porém quando se levou em consideração as estações do ano, diferenças
1015 significativas foram observadas na CDH apenas no período do verão e inverno, podendo
1016 estar relacionada às temperaturas extremas nestas estações assim como a variação de
1017 salinidade.

1018 Trabalhos com outras espécies de bivalves relatam que variações sazonais
1019 (principalmente mudanças da temperatura e salinidade da água) afetam diretamente a
1020 porcentagem ou circulação de hemócitos (Wootton & Papi 2003, Gagnaire *et al.* 2006,
1021 Cotter *et al.* 2010, Perrigault *et al.* 2011), e com isso o sistema imune dos organismos.
1022 Outros autores mencionam que a variação do sistema imune e a sanidade dos moluscos
1023 podem ser associadas ao estresse causado principalmente pela variação da salinidade, ou
1024 ação antrópica (Cheney *et al.* 2000, Burge *et al.* 2007).

1025 A apoptose é um processo fisiológico do organismo que assegura o
1026 funcionamento normal dos hemócitos, auxiliando no controle de infecções tanto
1027 bacteriana, como virais (Skolova *et al.* 2004, Sokolova 2009). Avaliar a quantidade de
1028 hemócitos que estão em apoptose, através do índice apoptótico, ajuda na compreensão
1029 do estado de saúde da espécie (Hughes *et al.* 2010). Portanto, se o índice apoptótico se

1030 encontra elevado (organismo buscando a homeostase), deduz-se que o indivíduo
1031 encontra-se com menos capacidade de resposta imune (Sokolova 2009).

1032 Neste trabalho, quando o índice apoptótico dos diferentes grupos de mariscos
1033 brancos coletados em diferentes pontos, sem levar em consideração as estações do ano
1034 foram comparados entre si (Figura 4), observou-se diferenças significativas e um
1035 aumento característico, deste índice, principalmente nos Molhes da Barra, EMA e
1036 Navio. Porém quando levou-se em consideração as estações do ano, as diferenças
1037 significativas observadas no verão, podem ser relacionadas ao estresse sofrido pelos
1038 organismos nesta época, tanto pela temperatura, quanto pela variação da salinidade
1039 influenciada pela desembocadura da laguna dos Patos, assim como o tráfego massivo de
1040 veículos e de pessoas. Hégaret *et al.* (2003) em um estudo imunológico com
1041 *Crassostrea virginica* observaram o aumento da mortalidade de hemócitos, utilizando
1042 citômetro de fluxo, supondo que esse fenômeno ocorreu pela exposição do bivalve a
1043 altas temperaturas. Enquanto que Gagnaire *et al.* (2006) em um estudo com *Crassostrea*
1044 *gigas* observaram que além da exposição a altas temperaturas (*in vitro* e *in vivo*) a
1045 exposição a hipo e hipersalinidades podem ocasionar a morte dos hemócitos, afetando
1046 assim diretamente o sistema imune dos organismos. É importante salientar que no ponto
1047 de coleta, Molhes da Barra, os níveis do índice apoptótico foram mais elevados,
1048 sugerindo que os organismos deste local estão mais estressados, e com isso mais
1049 vulneráveis a infecções ou patógeno (Best 2008).

1050 De acordo com Cremonte & Figueras (2004), estudos histopatológicos ao longo
1051 das áreas de distribuição do *M. mactroides* são necessários para compreender as causas
1052 da mortalidade massiva que esta espécie vem sofrendo. No exame histopatológico deste
1053 trabalho, observou-se a presença *Trichodina* sp., protozoários ciliados. Estudos
1054 realizados em Monte Hermoso, Argentina (Cremonte & Figueras 2004) e na praia do
1055 Cassino, Brasil (Carvalho *et al.* 2013a), também observaram a presença de *Trichodina*
1056 sp. em *M. mactroides*, o que leva a crer que a ocorrência destes organismos é comum
1057 nestes bivalves.

1058 *Trichodina* sp., têm sido identificado em todo o mundo em várias espécies de
1059 bivalves, não sendo classificados em geral como parasitos, mas sim comensais que se
1060 alimentam de bactérias presente nas brânquias dos hospedeiros (Lauckner 1983). Porém
1061 em grandes infestações podem interferir na função respiratória provocada pela produção
1062 de muco em excesso (Lom 1995) ou ser relacionado a mortalidades, como as relatadas
1063 em ostras na França (Boussaïd *et al.*, 1999).

1064 Kinne (1983) diz que doenças podem afetar a eficiência dos processos
1065 metabólicos, resistência a estresse e até mesmo a sobrevivência dos bivalves. Logo,
1066 mesmo que não sejam causas diretas de mortalidade, o acompanhamento de parasitos é
1067 fundamental para compreender o sistema imune e ou para estabelecer um futuro pacote
1068 tecnológico para o cultivo do marisco branco.

1069 Em todas as lâminas analisadas, mesmo nas que possuíam presença de
1070 *Trichodina* sp., não observou-se alterações microscópicas nos tecidos e brânquias ou
1071 infiltração hemocitária, não relacionando este protozoário a imunossupressão e aos
1072 surtos de mortalidades massivas de *M. mactroides* nesta região. Resultados semelhantes
1073 foram observados por Cremonte & Figueras (2004) e Carvalho *et al.* (2013a),
1074 trabalhando respectivamente com a espécie *M. mactroides*.

1075 Outra espécie que se observou neste estudo, foi um verme correspondente à
1076 classe Turbellaria, cuja presença está associada intimamente a moluscos marinhos
1077 (Lauckner 1983). Este verme pode ser considerado comensal, sendo observado na
1078 espécie *M. mactroides*.

1079 Em algumas das lâminas analisadas há presença de turbelários obstruindo a luz
1080 do trato digestório, muito embora essa ocorrência não tenha sido significativa e nem
1081 tampouco mostrou uma relação com as estações do ano ou com os pontos de coletas.
1082 Mas, segundo Carvalho *et al.* (2013a), estes vermes se encontram no trato digestivo
1083 prejudicando a absorção de nutrientes. A presença de turbelários no intestino do *M.*
1084 *mactroides* foi observada em estudos realizados na Argentina (Cremonte & Figueras
1085 2004), Uruguai (Brusa *et al.* 2006) e Brasil (Carvalho *et al.* 2013a). Para Carvalho *et al.*
1086 (2013a), estes organismos podem causar injúrias que afetam a fisiologia de alguns
1087 indivíduos, no entanto neste estudo não comprometem a sobrevivência da população
1088 hospedeira.

1089 Com base dos resultados até então mencionados, pode-se concluir que variáveis
1090 ambientais como temperaturas extremas observadas no período do verão e inverno,
1091 além das variações de salinidade em decorrer das estações do ano, podem estar afetando
1092 negativamente o sistema imune do *M. mactroides*, assim como a ação antropogênica.
1093 Porém, para determinar qual a real influência desses fatores sobre a eficiência do
1094 sistema imune, mais estudos devem ser realizados.

1095

1096

1097 **Referências**

- 1098 BASTIDA RO, EN IENO, JP MARTIN & E MABRAGAÑA. 1996. The yellow
1099 clam (*Mesodesma mactroides*): a case study of a coastal resource in risk from the
1100 South-West Atlantic Ocean. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 8: 165.
- 1101 BAUCHAU AG. 1981. In: *Invertebrate Blood Cells*, volumen 2. Academic
1102 Press, New York. pp. 385-420.
- 1103 BENINGER PG, GLE PENNEC & MLE PENNEC. 2003. Demonstration of
1104 nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the
1105 scallop *Pecten maximus*. *Biological Bulletin*, 205:83–92.
- 1106 BERGONCI PEA & THOMÉ JW 2008. Vertical distribution, segregation by
1107 size and recruitment of the yellow clam *Mesodesma mactroides* Deshayes, 1854
1108 (Mollusca, Bivalvia, Mesodesmatidae) in exposed sandy beaches of the Rio Grande do
1109 Sul state, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(2): 297-305.
- 1110 BEST SM. 2008. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row.
1111 *Annual Review of Microbiology*, 62: 171–182.
- 1112 BETTI M, C CIACCI, LC LORUSSO, B CANONICO, T FALCIONI & G
1113 GALLO. 2006. Effects of tumour necrosis factor a (TNFa) on *Mytilus* haemocytes: role
1114 of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biology of the Cell*, 98:
1115 233-244.
- 1116 BIGNELL J, M DODGE, S FEIST, B LYONS, P MARTIN, N TAYLOR, D
1117 STONE, L TRAVALENT & G STENTIFORD. 2008. Mussel histopathology: effects of
1118 season, disease and species. *Aquatic Biology*, 2: 1-15.
- 1119 BOUSSAÏD B, JL GRIPPARI, T RENAULT, G TIGEŞ & G DORANGE.
1120 1999. *Trichodina* sp. infestation of *Crassostrea gigas* oyster gills in Brittany, France.
1121 *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 339-342.
- 1122 BRUSA F, RP DE LEON & C DAMBORENEA. 2006. A new Paravortex
1123 (Platyhelminthes, Dalyellioida) endoparasite of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia,
1124 Mesodesmatidae) from Uruguay. *Parasitology Research*, 99: 566-571.
- 1125 BURGE CA, LR JUDAH, LL CONQUEST, FJ GRIFFIN, DP CHENEY, A
1126 SUHRBIER & B VADOPALAS. 2007. Summer seed: the influence of oyster stock,
1127 planting time, pathogens and environmental stressors. *Journal of Shellfish Research*, 26:
1128 163–172.

1129 CÁCERES-MARTÍNEZ J & R VÁSQUEZ-YEOMANS. 2008. La patología en
1130 moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en
1131 América Latina. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y
1132 manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su
1133 sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto
1134 de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO.
1135 pp. 327–337.

1136 CALIARI LJ & AHF KLEIN. 1993. Característica Morfodinâmica e
1137 Sedimentológicas das Praias Oceânicas Entre Rio Grande e Chuí, RS. *Pesquisas* 20(1):
1138 48-56.

1139 CANESI L, C CIACCI, R FABBRI, A MARCOMINI, G POJANA & G
1140 GALLO. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity.
1141 *Marine Environmental Research*, 76: 16-21.

1142 CARBALLAL MJ, MC LOPÉZ, C AZEVEDO, A VILLALBA. 1997.
1143 Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic*
1144 *Organisms*, 29: 127-135.

1145 CARVALHO YBM, LH POERSCH, JP JUNIOR & LA ROMANO. 2013a
1146 Histopathological survey of the yellow clam *Mesodesma mactroides* from southern
1147 Brazil. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 33(2): 53-58.

1148 CARVALHO YBM, LH POERSCH & LA ROMANO. 2013b. *Rickettsia*-
1149 associated mortality of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Bivalvia:
1150 Mesodesmatidae) in southern Brazil. *Malacologia*, 56(1-2): 301-3017.

1151 CHARRIAUT-MARLANGUE C & Y BEN-ARI. 1995. A cautionary note on
1152 the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*, 7: 61–64.

1153 CHENEY DP, BF MACDONALD & RA ELSTON. 2000. Summer mortality of
1154 Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple
1155 environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish*
1156 *Research*, 19: 353–359.

1157 COSCARÓN S. 1959. La almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*, Deshayes)
1158 de la costa de la Provincia de Buenos Aires. *Agro. Publ. Tec.* v. 1, n. 3, p. 1-66.

1159 COTTER E, SK MALHAM, S O'KEEFFE, SA LYNCH, JW LATCHFORD,
1160 JW KING & AR BEAUMONT. 2010. Summer mortality of the Pacific oyster,
1161 *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of growth, biochemistry and
1162 gametogenesis. *Aquaculture*, 303: 8–21.

1163 CREMONTE F & A FIGUERAS. 2004. Parasites as possible cause of mass
1164 mortalities of the critically endangered clam *Mesodesma mactroides* on the Atlantic
1165 coast of Argentina. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24: 166–
1166 171.

1167 DONAGHY L, B KIM, H KONG, H PARK & K CHOI. 2009. Flow cytometry
1168 studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe
1169 oyster, *Crassostrea ariakensis*. Fish & Shellfish Immunology, 27: 296-301.

1170 DONAGHY L & AK VOLETY. 2011. Functional and metabolic
1171 characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: *in vitro* impacts of
1172 temperature. Fish & Shellfish Immunology, 31: 808-814.

1173 FIORI S & NJ CAZZANIGA. 1999. Mass mortality of the yellow clam,
1174 *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mactracea) in Monte Hermoso beach, Argentina.
1175 Biological Conservation, 89: 305-309.

1176 FISHER WS. 2004. Antimicrobial activity of copper and zinc accumulated in
1177 eastern oyster amebocytes. Journal of Shellfish Research, 23: 321–351.

1178 GAGNAIRE B, H FROIN, K MOREAU, H THOMAS-GUYON & T
1179 RENAUT. 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the
1180 Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish & Shellfish Immunology, 20: 536-
1181 547.

1182 GOULLETQUER P, P SOLETSCHNIK, OLE MOINE, D RAZET, P GEAIRON,
1183 N FAURY & S TAILLADE. 1998. Summer mortality of the cupped oyster *Crassostrea*
1184 *gigas* in the bay of Marennes Oléron (France). ICES, Lisbon CM. CC(14): 14–20.

1185 HARVELL CD, CE MITCHELL, JR WARD, S ALTIZER, AP DOBSON, RS
1186 OSTFELD & MD SAMUEL. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial
1187 and marine biota. Science, 296: 2158-2162.

1188 HÉGARET H, GH WIKFORS & P SOUDANT. 2003. Flow-cytometric analysis
1189 of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden
1190 temperature elevation. II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis,
1191 and respiratory burst types and morphology. Journal of Experimental Marine Biology
1192 and Ecology, 293: 249-265.

1193 HERRMANN M. 2009. Population dynamics of the surf clams *Donax*
1194 *hanleyanus* and *Mesodesma mactroides* from open-Atlantic beaches off Argentina.
1195 Reports on Polar and Marine Research, 585, 235p.

1196 HERRMANN M, JEF ALFAYA, ML LEPORE, PE PENCHASZADEH & WE
1197 ARNTZ. 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam
1198 *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy, temperate
1199 beach in northern Argentina. *Helgoland Marine Research*, 65: 285–297.

1200 HOOKER SH. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand
1201 pipi *Paphies australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Bulletin of Marine Science*, 61(2):
1202 225-240.

1203 HUGHES FM, B FOSTER, S GREWAL & IM SOKOLOVA. 2010. Apoptosis
1204 as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus*
1205 *marinus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 247-257.

1206 KINNE. 1983, In: O. Kinne (Ed.), *Bivalvia to Scaphopoda, Diseases of marine*
1207 *animals*, Vol. II, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, p. 1038.

1208 KISS T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis*,
1209 15: 313-321.

1210 LAFFERTY KD, JW PORTER & SE FORD. 2004. Are diseases increasing in
1211 the ocean? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, vol. 35, pp. 31–54.

1212 LAUCKNER G. 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (ed.),
1213 *Diseases of Marine Animals*. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. 2: 467–1038.

1214 LOM J. 1995. Trichodinidae and other ciliates (Phylum Ciliophora). In: Woo,
1215 P.T.K. (ed.), “Fish diseases and disorders”, Vol. 1, Protozoan and metazoan infections,
1216 pp 229-262, CAB International.

1217 MALAGOLI D, D CONKLIN, S SACCHI, M MANDRIOLI & E
1218 OTTAVIANI. 2007. A putative helical cytokine functioning in innate immune
1219 signalling in *Drosophila melanogaster*. *Fish & Shellfish Immunology*, 1770: 974-978.

1220 MONARI M, V MATOZZO, J FOSCHI, O CATANNI, GP SERRAZANETTI
1221 & MG MARIN. 2007. Effects of high temperatures on functional responses of
1222 haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 98-114.

1223 MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura 2013. Boletim Estatístico da Pesca e
1224 Aquicultura, Brasil 2011. Brasília, Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em:
1225 <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%2](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)
1226 [02011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)> Acesso em: 8 ago. 2014.

1227 MYDLARZ LD LE JONES & CD HARVELL. 2006. Innate immunity,
1228 environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates.
1229 *Annual Review of Ecology And Systematics*, 37: 251–288.

1230 ODEBRECHT C, L RÖRIG, VT GARCIA & PC ABREU. 1995. Shellfish
1231 mortality and a red tide event in southern Brazil. In: LASSUS, P *et al* (eds.) Harmful
1232 marine algal blooms. Lavoisier. Paris, 213–218.

1233 OLIVIER SR. *et al*. 1971. Estructura de la comunidad, dinámica de la población
1234 y biología de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides* Desh., 1854) en Mar Azul
1235 (Pdo. de Gral. Madariaga, Bs. As., Argentina). Proy. Desarr. Pesq. FAO, Ser. Inf. Tecn.
1236 Publ., Mar del Plata, v. 27, p. 1-90.

1237 PERRIGAULT M, SF DAHL, EP ESPINOSA, L GAMBINO & B ALLAM.
1238 2011. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and
1239 QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters. Journal
1240 of Invertebrate Pathology, 106:322-332.

1241 PORTAL DA SECRETARIA DO TURISMO, ESPORTE E LAZER DO RS.
1242 2014. Disponível em: <<http://www.turismo.rs.gov.br>> Acesso em: 15 Julh.2014.

1243 PIPE RK & JA COLES. 1995. Environmental contaminants influencing immune
1244 function in marine bivalve molluscs. Fish & Shellfish Immunology, 5:581-595.

1245 ROMERO A, N ESTÉVEZ-CALVAR, S DIOS, A FIGUERAS & B NOVOA.
1246 2011. New Insights into the apoptotic process in Mollusks: characterization of caspase
1247 genes in *Mytilus galloprovincialis*. PLoS One. 6 p. e 17003.

1248 ROULSTON A, RC MARCELLUS & PE BRANTON. 1999. Viruses and
1249 apoptosis. Annual Review of Microbiology, 53: 577–628.

1250 RIOS EC. 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio
1251 Grande. 368p.

1252 SCHLEDER DD, M KAYSER, S SÜHNEL, J.F FERREIRA, G.S RUPP & M.A
1253 BARRACO. 2008. Evaluation of hemato-immunological parameters during the
1254 reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-
1255 enriched diet. Aquaculture, 280: 256-263.

1256 SOKOLOVA IM, S EVANS & FM HUGHES. 2004. Cadmium-induced
1257 apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no
1258 mitochondrial permeability transition. The Journal of Experimental Biology, 207: 3369-
1259 3380.

1260 SOKOLOVA IM. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. Invertebrate
1261 Survival Journal. 6: 49-58.

1262 URBAN HJ. 2000. Culture potential of the Caribbean pearl oyster (*Pinctada*
1263 *imbricata*) from the Caribbean. II. Spat collection, growth and mortality in culture
1264 systems. *Aquaculture*, v. 189, p. 375-388.

1265 URIARTE I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En
1266 A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos
1267 bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América
1268 Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt,
1269 Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.pp. 61–75.

1270 VARGAS-ALBORES F & M.A BARRACCO. 2001. Mecanismos de Defensa
1271 de los Moluscos Bivalvos. In: *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica*; Ciencia y
1272 Acuicultura. MAEDA-MARTINEZ, A. N. (ed). Editorial Limusa, México, 7: 127-146.

1273 WARD JR & KD LAFFERTY. 2004. The elusive baseline of marine disease: are
1274 diseases in ocean ecosystems increasing? *PLOS Biology*, 2: 0542–0547.

1275 WOOTTON EC & RK PIPI. 2003. Structural and functional characterisation of
1276 the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. *Fish & Shellfish*
1277 *Immunology*, 15: 249–262.

1278 WEIBEL ER. 1980. *Stereological methods*. London: Academic, 2: 253-257.

1279

1280

1281

1282

1283

1284

1285

1286

1287

1288

1289

1290 **Conclusões gerais e perspectivas futuras**

1291 O marisco branco *M. mactroides* apresentou predomínio dos hemócitos
1292 granulares em sua hemolinfa, que é um bom indicativo da eficiência da resposta imune.

1293 A ocorrência de *Trichodina* sp. e turbelários encontrados não pode ser
1294 relacionadas com a imunossupressão da espécie *M. mactroides*.

1295 O presente estudo demonstrou que apesar das diferenças estatísticas na CDH
1296 (HH e HG) em alguns pontos de coleta, no verão e inverno, assim como variação
1297 estatística no índice apoptótico na Barra dos Molhes (no verão), no geral, o sistema
1298 imune do *M. mactroides* demonstrou-se estável no decorrer da pesquisa.

1299 Alterações estatísticas encontradas no trabalho podem ser provenientes das ações
1300 antropogênicas, tais como maior acessibilidade e tráfego de carros (causando uma maior
1301 compactação e alteração do solo comparado com os demais pontos), ou outros fatores
1302 como: variação de temperatura e salinidade, fluxo de corrente, aporte fluvial dentre
1303 outros.

1304 Sendo assim, mais estudos referentes à saúde desta espécie precisam ser
1305 realizados, com monitoramento ambiental e testes imunes específicos em laboratório,
1306 para determinar a influência dos parâmetros ambientais, (temperatura, salinidade) no
1307 sistema imune de *M. mactroides*.