



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E AMBIENTE

**Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, dos
Policlorobifenis e de *Vibrio alginolyticus* no sistema imunitário
do mexilhão do Mediterrâneo, *Mytilus galloprovincialis*
(Lamarck, 1819)**

(Tese definitiva para obtenção do grau de Mestre no ramo de Biologia Marinha,
especialização em Pescas e Aquacultura)

Mafalda Raquel Vitorino Afonso

FARO 2008

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E AMBIENTE

Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH), dos Policlorobifenis (PCBs) e de *Vibrio alginolyticus* no sistema imunitário do mexilhão do Mediterrâneo, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

(Tese definitiva para obtenção do grau de Mestre no ramo de Biologia Marinha, especialização em Pescas e Aquacultura)

Mafalda Raquel Vitorino Afonso

Tese orientada por: Dr. António Figueras Huerta
Dr. Rui Cabral e Silva

Realizada no Instituto de Investigações Marinhas de Vigo, no Departamento de Patologia de Organismos Marinhos, com início a 5 de Outubro e fim a 31 de Abril
Trabalho pertencente ao Projecto “Improved immunity of aquacultured animals (IMAQUANIM)”

FARO 2008

Resumo

O aumento da poluição e a existência de bactérias no ambiente marinho são dois problemas que têm vindo a crescer ao longo das décadas e que se encontram associados a episódios de mortalidade e a alterações no sistema imunitário de diferentes invertebrados marinhos. A produção de mexilhão do Mediterrâneo, *Mytilus galloprovincialis*, na costa Galega tem uma grande importância económica, no entanto este cultivo encontra-se ameaçado. A ocorrência de episódios de marés negras associados ao elevado tráfego marítimo são as principais ameaças ao cultivo de mexilhão, características que se relacionam com a capacidade que estes têm em acumular grandes concentrações de contaminantes e patógenos.

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito dos PAH e PCBs no sistema imunitário de exemplares de *Mytilus galloprovincialis* e observar o efeito da exposição aos contaminantes em animais infectados e não infectados com *Vibrio alginolyticus* expostos a contaminantes. Realizaram-se tratamentos *in vitro* e *in vivo* com distintas concentrações de PAH (Fenantreno e Benzo[a]pyreno) e PCB a tempos distintos para determinar a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), de radicais de azoto (NO) e a capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão. A produção de ROS foi determinada a partir da medição da resposta quimioluminescente (QI), a produção de NO através da reacção colorimétrica de Griess (Green *et al.* 1982) e para a capacidade fagocítica utilizou-se a citometria de fluxo. Utilizaram-se juvenis de mexilhão com o objectivo de determinar a taxa de mortalidade nas seguintes condições: foram expostos sete dias a contaminantes e dez dias a contaminantes e a uma infecção experimental.

Os resultados obtidos no trabalho mostram que os mecanismos do sistema imunitário estudados e a ocorrência de doenças infecciosas causadas por bactérias estão dependentes da concentração, do tempo de exposição e das características de cada contaminante. Apesar do sistema imunitário dos exemplares de *Mytilus galloprovincialis* se encontrar debilitado não se registaram taxas de mortalidade significativa, o que faz pensar que estes já ganharam resistência a este tipo de contaminantes e que os mecanismos deste sistema são eficazes.

Palavras-chave: *Mytilus galloprovincialis*, PAH, PCBs, *Vibrio alginolyticus*, sistema imunitário

Abstract

The increasing pollution and pathogenic bacteria in marine environment are two problems that have been growing on the last decades and are associate with mortalities episodes and changes in immune system of different marine invertebrates. The Mediterranean mussel production in Galician coast has a big economic interest, but this culture is frequently put at risk by the high traffic of the shippis and infections disease.

Our main objective for this work was to study the effects the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and Polychlorobiphenils (PCBs) in the immune system of *Mytilus galloprovincialis*, by exposing infected and non-infected individuals with *Vibrio alginolyticus*, to these contaminants. To determine the production of toxic reactive oxygen intermediates (ROS), nitrogen radicals (NO) and the haemocytes phagocytic capacity of both *in vitro* and *in vivo* mussels, we submitted them to different concentrations of PAH and PCBs, for different periods of time. ROIs production was determined through the chemiluminescence response, NO production from the Griess colorimetric reaction and the phagocytic capacity was measured by citometry flux. Mortality rate was determined by exposing juvenile mussel for seven days to the contaminants, plus ten days to the contaminants and *Vibrio alginolyticus* infection.

Our results show that the immune system mechanisms and the occurrence of infectious diseases caused by bacteria are related to the concentration, time of exposure and the characteristics of each contaminant. It was also verified that mortality rate was not significant, despite of the *Mytilus galloprovincialis* poor immune system conditions, which makes to suppose that these mussels may have acquired a capacity to live with this type of contaminants, releasing the immune system mechanisms to other defensive actions.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, PAH, PCBs, *Vibrio alginolyticus*, immune system

Agradecimentos

Agora que chega ao fim uma etapa da minha vida revivo tudo o que passei e todas as pessoas que me ajudaram a completar esta e a começar outra.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Projecto *Improved immunity of aquacultured animals* (IMAQUANIM) por me ter dado a hipótese de trabalhar numa área desconhecida e por me ter proporcionado umas óptimas condições de trabalho. Agradeço ao Dr. António Figueras e à Dra. Beatriz Novoa por me terem aceite no departamento de Patologia do CSIC. Agradeço as oportunidades que me deram em trabalhar com pessoas tão competentes e por me terem proporcionado o enriquecimento numa área que me era desconhecida, a Imunologia. Um obrigado a todos os meus colegas do Departamento de Patologia (Sónia, Camino, Raquel, Alex, Rubem, Ivan, Pepe) cada um, de forma diferente, ajudou-me a superar todas as minhas dificuldades! Ari, Marimar e Maria... Ari, obrigado pela ajuda que me deste com o Citómetro e pelos momentos de descontração ao longo do dia! Marimar, sem ti não teria aprendido tanta coisa. Obrigado pela orientação no primeiro mês de laboratório, pela força e palavras de apreço quando já não aguentava mais. Mesmo distante revelaste-te uma força para mim! Maria... A ti muito tenho que agradecer, sobretudo quando me faltava um mês para vir embora e tinha tanto trabalho para fazer! Posso dizer que ganhei 3 novas amigas, que sempre me fizeram sentir bem e que sempre demonstraram preocupação pela mais novinha do *despacho*... Obrigado por me fazerem sentir em casa quando tentavam cantar os “Peitos da cabritinha”! Ao Rubén agradeço pela ajuda imprescindível que me deu com os meus mexilhões e pelas vezes em que me dizia “*Vá Força, ja te queda poço*”.

Ao Professor Rui Cabral e Silva, muito obrigado por ser meu orientador e por todo o apoio dado durante este tempo.

A todos os caloiros de 2006 um obrigado por a vossa amizade e por bons momentos de lazer! Não poderia deixar de agradecer aos meus caloiros, caloiros que se tornaram grandes amigos e imprescindíveis para a realização desta tese! Xuxu, Sininho, Templária, Márcio, Oxy e Sara (Kiki) não poderia deixar de citar o vosso nome.... Xuxu, Sininho e Templária, obrigado pelas belas tardes passadas na vossa varanda e pelos jantares feitos pelo Sinocas! Oxy... não tenho palavras para definir um amigo como tu! Márcio, o afilhado com pior feitio (risos)! Kiki, não podia deixar de te agradecer por seres a minha companheira do belo abdominal (risos)! A todos os meus

colegas de turma um grande obrigado! A vocês muito tenho que agradecer. Tufinho, por muito passámos, por muitos jantares, por muitas Semanas Académicas, por pouco estudo (brincadeira) e por uma grande amizade! Cristovão...Tenho que te agradecer pelas vezes em que me chateaste com o que queria fazer no futuro e com o que era melhor para mim! Pico, Tiago, Tininha, Rita e Topo obrigado pelos seis melhores anos da minha vida!

Sid!!! Ainda me lembro das vezes em que amparaste a tua madrinha nos maus momentos...Com a tua ajuda muita coisa ultrapassei e quero que saibas que foste a pessoa que me deu mais força para ir para Vigo. Obrigado por tudo e pelo amigo que ganhei, TU! Lauro obrigado por tudo! Tenho que te agradecer pela paciência que tiveste comigo. Revelaste te uma pessoa excepcional, um amigo que me marcou e uma amizade que vai ficar para sempre...Pipa, Muuu, Filipa, Nocas e Nani... Que posso eu dizer de vocês?! Graças a vocês muito aprendi e muito vivi! Graças a vocês acreditei que ainda existe amizade... Obrigado pelas vezes em que me ouviram, principalmente nas alturas em que queria ir embora de Vigo, em que estava com saudades de todos.

Inês e Fia... Fia a ti tenho que agradecer por teres estado sempre a meu lado, desde a escola primária. Uff... Tanto tempo! Inês posso dizer que és a minha segunda irmã! Obrigado por seres a minha amiga...

À minha família... à minha avó Alice, aos meus tios e primos agradeço por toda a força que me deram desde criança! Sem vocês não teria conseguido ultrapassar as etapas mais difíceis da minha vida! Bruna obrigado por tudo o que fizeste por mim! Sem ti sei que muito do que tenho e do que fiz não o teria conseguido... Obrigado! Aos meus pais agradeço por me terem proporcionado a família que tenho, os estudos que tenho, o que fui e o que sou hoje. A vocês devo tudo, obrigado por serem os melhores pais.

Aos meus pais...

Índice

Introdução geral	9
Objectivos	18
Capítulo 1: Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e dos Policlorobifenis no sistema imunitário de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	19
Introdução	20
Materiais e Métodos	22
Recolha e tratamento dos animais	22
Tratamentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	22
Stress Oxidativo	22
Produção de NO	23
Fagocitose	23
Estatística	24
Resultados	25
Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no stress oxidativo	25
Efeito do pré-tratamento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no stress oxidativo	26
Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na produção de NO	30
Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na fagocitose	32
Efeito de Policlorobifenis no stress oxidativo	33
Efeito do pré-tratamento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com Policlorobifenis no stress oxidativo	34
Efeito dos Policlorobifenis na produção de NO	36
Efeito dos Policlorobifenis na fagocitose	37
Discussão	38
Capítulo 2: Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Policlorobifenis no sistema imunitário de <i>Mytilus galloprovincialis</i> frente a uma infecção experimental com <i>Vibrio alginolyticus</i>	42

Introdução	43
Material e Métodos	45
Recolha e tratamento de animais	45
Preparação dos estímulos	45
Tratamento <i>in vivo</i>	45
Stress Oxidativo	46
Produção de NO	46
Fagocitose	46
Mortalidade	46
Estatística	46
Resultados	47
Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e de <i>Vibrio alginolyticus</i> no stress oxidativo	47
Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e de <i>Vibrio alginolyticus</i> na produção de NO	49
Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e de <i>Vibrio alginolyticus</i> na fagocitose	50
Efeito dos Policlorobifenis e de <i>Vibrio alginolyticus</i> no stress oxidativo	51
Efeito dos Policlorobifenis e de <i>Vibrio alginolyticus</i> na produção de NO	52
Efeito dos Policlorobifenis e de <i>Vibrio alginolyticus</i> na fagocitose	53
Taxa de mortalidade	53
Discussão	55
Conclusões Finais	58
Referências Bibliográficas	59
Anexos	70

Introdução Geral

1. Cultivo do mexilhão na costa Galega

Do ponto de vista histórico, o mexilhão é considerado desde há muito tempo como fonte de alimento para os habitantes da costa Galega, como se testemunhou com os diversos vestígios encontrados em escavações de castros e nos documentos históricos (Vázquez, 1975). Esta relação remonta ao século V a.C e foi progredindo ao longo do tempo, tornando-se uma tradição de grande importância que deu origem a um sistema de criação específico, conhecido a nível internacional por “galician system”, a equipamentos de materiais de concepção regionais e a práticas de criação tradicionais que permitem a obtenção de um produto característico.

O cultivo do mexilhão, denominado de *miticultura*, começou por ser realizado em cultivos em *empalizadas* ou *bouchots*, em França, até princípios do século XIX. Esta técnica consistia em estacas de madeira, colocadas na zona intramareal, com redes onde os mexilhões se fixavam. Devido ao grande tamanho obtido por estes organismos num curto período de tempo esta técnica expandiu-se. Mas em 1980, na Holanda, apareceu o cultivo de parque onde os bivalves de pequeno tamanho se fixavam no fundo até alcançarem o tamanho comercial. Em 1946, surge o cultivo em suspensão, em Espanha, que consiste em plataformas flutuantes, ou *bateas* (Fig. 1), com cordas, onde os mexilhões juvenis se fixam permanecendo aderidos até que obtêm o tamanho comercial (Figueras & Cáceres, 2007)



Figura 1 – Representação de *bateas* na Ría de Arousa, Vigo.

A costa Galega possui cerca de 1309 km e é constituída pelas Rías Galegas, isto é, uma série de vales submergidos que formam parte de um caudal fluvial. Estas rias apresentam uma elevada produção primária e uma grande produção de moluscos bivalves, especialmente *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*, espécies que ocupam níveis baixos na cadeia alimentar, uma condição indispensável para obter rendimentos

máximos. Segundos dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), o cultivo de bivalves é uma das maiores produções de aquacultura na Europa, sendo produzidas anualmente 1.500.000 toneladas de mexilhão em todo o mundo, sendo que 48% desta produção pertence a países da União Europeia. A região da Galiza é considerada a segunda potência de produção de mexilhões a nível mundial, sendo que os valores de produção oscilam entre 150.000 e 300.000 toneladas (Fig. 2).

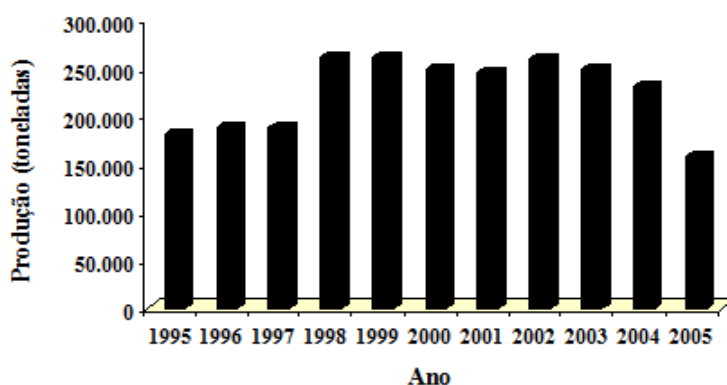


Figura 2 – Produção média anual de mexilhão em Galiza (Fonte: dados estatísticos fornecidos pela FAO)

Apesar desta costa ter umas condições favoráveis à produção de mexilhão existe um sério problema, o elevado tráfego marítimo existente nesta costa. Sabe-se que 40.000 a 60.000 barcos passam pela costa galega por ano (aproximadamente 120 por dia) e 20% destes transportam produtos perigosos, como por exemplo, petróleo (González-Laxe, 2004). A costa Galega tem sido afectada por sucessivas marés negras devido à quantidade de petroleiros que passam nesta região, o que levou a vários estudos a nível da fauna e flora (Ordás *et al.*, 2007).

Os mexilhões, do género *Mytilus*, são considerados os melhores indicadores e sentinelas de contaminantes em monitorização de sistemas aquáticos, pois apresentam uma distribuição ubíqua, indicam diferentes tipos de poluentes, acumulam elevadas concentrações de contaminantes, podem tolerar diversos poluentes ambientais e são a espécie de bivalve mais comercializada em todo o mundo (Kim & Kim, 2002). Devido a estas características é necessário ter especial atenção a estes organismos nesta zona costeira, uma vez que se encontram susceptíveis a marés negras, a infecções por patógenos (Coles & Pipe, 1994; Coles *et al.*, 1995) e, também, podem ser um risco para os humanos como descrito por Lemiere *et al.*, (2005) devido à sua posição na cadeia trófica.

2. Sistema imunitário dos moluscos bivalves

Os vertebrados apresentam um sistema de defesa com mecanismos específicos e não específicos, sendo que os primeiros se desenvolvem em resposta a um estímulo concreto e os segundos são inatos, actuando independentemente da natureza do estímulo. Os invertebrados, como os moluscos bivalves, só apresentam mecanismos de defesa não específicos, que se dividem em factores humorais e celulares, não apresentando imunoglobinas nem memória imunitária do primeiro contacto com o patógeno (Roch, 1999).

2.1 Defesa celular

A defesa inata dos moluscos baseia-se numa componente inata, um sistema não linfóide que envolve corpos celulares e componentes humorais (Cheng, 1983). Nos mexilhões, os mecanismos celulares são realizados por células hemolinfáticas denominadas de hemócitos (Feng, 1988).

Morfologia e Classificação dos hemócitos

A palavra hemócito foi designada para as células hemolinfáticas dos bivalves que se movem livremente no sistema circulatório aberto, constituindo a primeira linha de defesa contra os microorganismos invasores (Adema *et al.*, 1991). Estas células encontram-se envolvidas em mecanismos de transportes e de reparação da concha (Cheng, 1981, 1984; Mount *et al.*, 2004) e constitui uma população celular muito variável que não se encontra caracterizada em tipos de células, linhagens e funções (Bachère *et al.*, 1995).

Foram feitas várias tentativas para classificar os hemócitos em relação à sua morfologia e à sua função, mas apesar destas tentativas a variabilidade e as diversas interpretações têm dificultado uma possível classificação (Pipe & Coles, 1995). A classificação feita por Cheng (1981) é a mais utilizada actualmente e baseia-se em características morfológicas, sendo os hemócitos classificados em hialinócitos e granulócitos. Denominam-se de granulócitos devido ao aspecto que os vários lisossomas ou grânulos apresentam no citoplasma, à elevada capacidade de estender os pseudópodes e à capacidade fagocitária que têm (Fisher, 1986; Feng, 1988). Os hialinócitos são células de forma redonda com elevada proporção de núcleo, i.e., o citoplasma apresenta menos lisossomas que os granulócitos (Feng, 1988).

Função imunitária dos hemócitos

A capacidade de resposta defensiva dos hemócitos engloba a fagocitose ou encapsulação, seguida da destruição do patógeno via actividade enzimática e geração de metabolitos de oxigénio e de azoto (Wootton *et al.*, 2003a).

1. Resposta Inflamatória

No processo inflamatório, constituído por componentes humorais e celulares, define-se como recrutamento hemocitário e libertação de proteínas plasmáticas no lugar da infecção (Abbas & Lichtman, 2000). A resposta inflamatória é iniciada por uma lesão nos tecidos desencadeada pela entrada de um organismo estranho de origem física, química e/ou biológica e termina na destruição do tecido danificado, na extracção do organismo estranho e/ou na reparação do tecido (Feng, 1988). O acesso de um organismo invasor ao hospedeiro encontra-se limitado uma vez que os bivalves apresentam barreiras físico-químicas que se comportam como obstáculos às invasões (Canesi *et al.*, 2002), como por exemplo a concha e mucus pois estes apresentam enzimas com actividade antibacteriana (Ratcliffe *et al.*, 1985).

Quando os patógenos atravessam estas barreiras e penetram no hospedeiro, são as componentes celulares e humorais que participam na destruição do patógeno. Os hemócitos têm um papel importante na reparação do tecido, processo que pode ser composto por diversas etapas tais como: migração dos hemócitos até ao lugar da ferida (Fisher, 1986), formação de tampão de hemócitos que limita a perda de hemolinfa; troca do tecido danificado; produção de colagénio através dos fibroblastos (Ruddell, 1971); eliminação dos restos celulares via fagocitose e restauração do tecido (Ratcliffe *et al.*, 1985).

2. Fagocitose

Elie Metchnikoff (1980, in Roch, 1999) reconheceu a fagocitose como um importante mecanismo de defesa celular nos animais em que as células têm capacidade de absorver as partículas. É um mecanismo que não se encontra só envolvido na nutrição, na capacidade fagocítica das células mas também no sistema de defesa celular (Roch, 1999). Este mecanismo tem como objectivo neutralizar e eliminar todos os materiais desconhecidos, incluindo partículas inorgânicas e organismos vivos (patogénicos ou não patogénicos). Em moluscos bivalves este processo foi detectado em diferentes espécies tais como a amêijoia fina e a americana, *Ruditapes decussatus* e

Mercenaria mercenaria (Tripp, 1992; López *et al.*, 1997) e no mexilhão do Mediterrâneo, *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997).

A fagocitose pode-se dividir em diversas fases, entre as quais se destacam cinco: reconhecimento de invasores, adesão, ingestão destruição e eliminação (Pipe & Coles, 1995). O reconhecimento de partículas estranhas produz-se através da interacção entre hemócitos e vários péptidos antimicrobiais (Feng, 1988; Fawcett & Tripp, 1994); no processo de adesão as proteínas existentes no soro, como aglutininas, medeiam a união entre o agente estranho e os possíveis receptores presentes na superfície celular dos hemócitos; na destruição e digestão do patógeno há produção de vacúolos fagocíticos denominados de fagossomas que interagem com os lisossomas presentes nos hemócitos (Fisher, 1986). Os lisossomas têm uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas ácidas que atacam os fagossomas, onde ocorre libertação do conteúdo lisossomal para o interior destes destruindo o patógeno (Ratcliffe *et al.*, 1985; Fisher, 1986).

3. Agregação

Este mecanismo ocorre quando a hemolinfa é invadida por um elevado número de organismos invasores e a fagocitose por si só não consegue elimina-los (Ratcliffe *et al.*, 1985). Os hemócitos juntamente com outras células não fagocíticas unem-se por filópodes e os organismos acabam por ser apanhados, formando-se um depósito de melanina.

4. Encapsulação

Quando um agente exógeno é capaz de passar as barreiras da fagocitose e agregação, dá-se a encapsulação onde ocorre a entrada dos microorganismos (Fisher, 1986; Feng, 1988). As partículas cujo tamanho supera o dos hemócitos são rodeadas por estes constituindo-se uma série de capas concêntricas, onde as mais internas são formadas por fibroblastos e as mais externas por materiais fibrosos formando um retículo em associação com glicoproteínas (Cheng & Rifkin, 1970).

5. Libertação de Radicais tóxicos de oxigénio

Na fagocitose ocorre o stress oxidativo, ou seja, libertação de radicais livres de oxigénio (ROS). O consumo de oxigénio (O_2) deve-se à acção de um complexo multiproteico denominado de NADPH-oxidase e mieloperoxidase (MPO), em que o primeiro complexo é utilizado por neutrófilos com a responsabilidade de transferir os electrões desde NADPH a O_2 e consequentemente produzir o radical super óxido; a

MPO é uma enzima intracelular localizada, principalmente, no interior dos lisossomas (Austin & Paytner, 1995). Estas duas enzimas formam um sistema denominado de MPO-peróxido-hálico que transforma o O_2 molecular em ROIs tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxil ($-OH$) e ácido hipocloroso ($OHCl$) (Torreilles *et al.*, 1996) (Fig. 3)

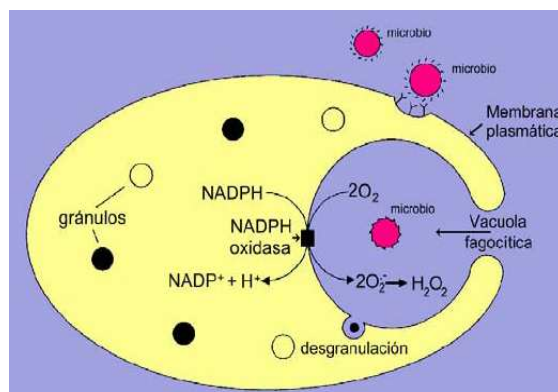


Figura 3 – Representação esquemática do stress oxidativo de um hemócito.

Os ROS são moléculas tóxicas que podem actuar isoladamente ou em interacção com enzimas hidrolíticas libertadas no processo fagocítico (Adema *et al.*, 1991). Existem várias técnicas para detectar estas moléculas tais como a redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT), quantificação espectroscópica e quimioluminescência (QI). O NBT serve para medir a produção de ROS intracelular e apresenta cor amarela quando está reduzida e cor azul quando está oxidada (Pipe, 1992); a produção extracelular de ROS quantifica-se espectroscopicamente mediante redução do citocromo C (Pipe *et al.*, 1997); a QI permite medir a produção de ROS, quer intracelular quer extracelular, mas com uma maior sensibilidade que os métodos anteriormente referidos. Os ROIs são moléculas que se encontram no estado excitado, no entanto estes tendem a regressar ao seu estado basal e ao fazerem-no há libertação de electrões acompanhados de uma emissão de fotões, ou QI. Como esta emissão de luz é muito débil utilizam-se moléculas para amplificar o sinal, tais como o luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (Allen & Loose, 1976). O luminol é reduzido ao receber os electrões libertados pelos ROIs e quando regressa ao estado basal emite novamente luz e fotões, mas neste momento o sinal luminoso é 1000 vezes mais intenso e detectável num luminómetro.

A produção destes radicais tem-se detectado em diversas espécies de moluscos, como a ostra americana, *Crassostrea virginica* (Anderson, 1994), a amêijoia americana, *Mercenaria mercenaria* (Buggé *et al.*, 2007), o mexilhão azul, *Mytilus edulis* (Pipe, 1992) e o mexilhão do Mediterrâneo, *Mytilus galloprovincialis* (Torreilles *et al.*, 1996; Ordás *et al.*, 2000) mas no entanto sabe-se que dentro da mesma espécie há grandes variações quanto à emissão QI (Bachere *et al.*, 1995).

6. Libertação de Radicais de Azoto

O Óxido Nítrico (NO) é uma molécula de grande importância na defesa dos organismos e é caracterizado por ser um radical livre instável e altamente reactivo, produzido por oxidação de L-arginina e mediado pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) (Rivero, 2006). Nos moluscos demonstrou-se a presença de actividades de NOS e a libertação de NO_2^- e NO_3^- em hemócitos de espécies com *Crassostrea gigas* (Torreilles & Romestand, 2001), *Crassostrea virginica* (Villamil *et al.*, 2007), *Ruditapes decussatus* (Tafalla *et al.*, 2003), *Mytilus edulis* (Ottaviani *et al.*, 1993) e *Mytilus galloprovincialis* (Arumugam *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Tafalla *et al.*, 2002; Novas *et al.*, 2004). Na maioria dos trabalhos referidos, os radicais de NO libertam-se através da estimulação dos hemócitos com partículas como forbolacmiristato-acetato (PMA) (Tafalla *et al.*, 2002), laminarina (Arumugam *et al.*, 2000), lipopolissacarideo (Ottaviani *et al.*, 1993), zimosan (Tafalla *et al.*, 2003) ou a utilização de organismos vivos (Villamil *et al.*, 2007).

Para medir a produção destes radicais em bivalves há uma variedade de técnicas, mas a mais conhecida e utilizada é a reacção colorimétrica conhecida por reacção de Griess (Green *et al.*, 1982). Os radicais de NO_2^- formam-se aquando da transformação de NO e com a reacção de sulfanilamida dão origem ao sal Diazónio. Este sal, juntamente com outros compostos da reacção dá lugar a um produto com determinado espectro de absorção. Esta é uma medição indirecta onde a quantidade obtida, i.e., calculada mediante uma recta padrão, é proporcional a quantidade de NO produzida (Tafalla *et al.*, 2002).

Receptores implicados no sistema de defesa

Os receptores *Toll-like* (TRLs) são moléculas caracterizadas por terem um domínio extracelular com repetições de leucina (LRR), cisteína, um domínio transmembranar (TM) e um domínio intracelular denominado de Tool/IL-1 (TIR) (Abbas & Lichtman, 2000) que actuam como receptores de padrões de reconhecimento (PRRs) quando associados ao reconhecimento de péptidos antimicrobianos (Medzhitov *et al.*, 1997). *Crassostrea gigas* (Tanguy *et al.*, 2004) e *Argopecten irradians* (Song *et al.*, 2006) são exemplos de bivalves em que já se identificaram homólogos a TRLs.

2.2 Defesa Humoral

A defesa humoral dos moluscos bivalves é constituída por lisossomas, aglutininas, lectinas, péptidos antimicrobiais (Tiscar & Mosca, 2004), proteínas anti-choque térmico (HSPs), sistema pro-fenol oxidase (proPO), proteasas e complemento.

A libertação de enzimas lisossomais (β -glucoronidase, fosfatase ácida e alcalina, lisossoma e lipase), contidas nos lisossomas de hemócitos granulares, para o soro depende da desgranulação da célula durante a fagocitose (Pipe, 1990). Estas enzimas podem, também, ter uma função digestiva indicada pela sua abundância nas glândulas digestivas (Tiscar & Mosca, 2004).

Várias lectinas têm sido descritas em bivalves, como ostras e mexilhões, no entanto estas apresentam diferenças no tamanho da molécula nativa ou na sub-unidade estrutural, nas propriedades da aglutinação e/ou na ligação específica do açúcar. Nestes animais as lectinas são opsoninas, ou seja, tem capacidade de produzir os elementos exógenos nos mecanismos de defesa e encontram-se envolvidas no reconhecimento da célula (Canesi *et al.*, 2002), sendo específicas para os hemócitos promovendo o reconhecimento de células desconhecidas (Tiscar & Mosca, 2004).

Péptidos antimicrobiais são moléculas caracterizadas por um elevado conteúdo de cisteína e encontram-se unidas às membranas plasmáticas dos microorganismos (Mitta *et al.*, 2000) Isto dá-se devido à existência de forças electrostáticas, de modo que as cargas positivas dos péptidos antimicrobiais atraem as cargas negativas das cabeças fosfolipídicas existentes nas membranas de modo a alterar a permeabilidade das mesmas e a provocar a lise celular (Huang, 2000). Recentemente observou-se a existência de vários péptidos antimicrobiais em duas espécies de mexilhões (Mitta *et al.*, 2000; Pallavicini *et al.*, 2008), que se encontram classificados em três grupos diferentes: as miticinas, mitilinas e defensinas que actuam contra distintos microorganismos, isto é, as miticinas e defensinas são essencialmente activas contra as bactérias Gram positivas, incluindo alguns patógenos para invertebrados marinhos (Pallavicini *et al.*, 2008) e as mitilinas são tóxicas para as bactérias Gram negativas e positivas (Mitta *et al.*, 2000).

As proteínas anti-choque térmico (HSPs) são produzidas quando as células de alguns organismos são confrontadas com um aumento da temperatura, no entanto demonstrou-se que estas podem ser estimuladas por outros factores tais como falta de oxigénio, presença de metais pesados, agentes físicos e químicos ou outro factor que produza “stress” celular (Craig, 1985).

O sistema pro-fenol-oxidase é um componente importante das respostas imunes de muitos invertebrados, tendo sido identificado na hemolinfa e em hémocitos de moluscos (Hernández-López *et al.*, 1996), tais como na ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Hellio *et al.*, 2007), no mexilhão azul *Mytilus edulis* (Coles & Pipe, 1994b) e mexilhão verde *Perna viridis* (Asokan *et al.*, 1997). Este sistema é uma pro-enzima inactiva que pode ser activada por baixas concentrações de estímulos como lipopolissacarídeos (LPS), β -1-3-glucanos e peptidoglicanos (Söderhall & Kall, 1984; Ratcliffe *et al.*, 1991). Esta enzima tem um papel importante no processo de melanização e na síntese de adrenalina (Coles & Pipe, 1994b), podendo activar a fagocitose e a encapsulação (Söderhall & Smith, 1986).

As proteases são enzimas com função reguladora em vários processos fisiológicos (Gorman *et al.*, 2000; Hiemstra, 2002) de organismos vivos. No entanto, também se encontram presentes em patógenos com uma função protectora contra os mecanismos de defesa presentes no hospedeiro (Ordás *et al.*, 2001). A existência de proteases exógenas e a necessidade de controlar as proteases endógenas fez com que os organismos desenvolvessem as Inibidoras de Proteases (PI) (Laskowski & Kato, 1980), isto é, enzimas inibidoras que evitam a propagação dos patógenos (Freedman, 1991).

As citoquinas são glicoproteínas sintetizadas por células do sistema imune ou endócrino e têm como função principal actuar como moduladores dos principais processos do sistema imune (Nistico, 1993; Blalock, 1994).

O Sistema Complemento é composto por um conjunto de proteínas de membrana plasmática e solúveis na hemolinfa que participam na destruição de microorganismos, como na fagocitose (Abbas & Lichtman, 2000). A activação deste complemento pode-se dar através de três vias diferentes: via clássica, em que o sistema é activado por meio de imunocomplexos formados pela Imunoglobina G ou M (IgG ou IgM) e anticorpos; a via alternativa, que se inicia por meio do reconhecimento de PAMPs, que se encontram presentes na superfície de microorganismos, sendo mediada pela acção da proteína C3 (Abbas & Lichtman, 2000); a via lectina activa-se na presença de uma molécula denominada lectina em união a manosa (MBL) que reconhece os carboidratos presentes na membrana plasmática dos microorganismos

Objectivos

1. Estudar o efeito do Fenantreno, do Benzo[a]pyreno (PAH) e PCBs na resposta imune dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis*.
2. Estudar a resposta imune dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* expostos a PAH e PCBs sob o efeito de uma infecção experimental de *Vibrio alginolyticus*.
3. Verificar o aumento da susceptibilidade de doenças infecciosas causadas por *Vibrio* em exemplares de mexilhões expostos a contaminantes.
4. Observar a taxa de mortalidade em juvenis de mexilhão expostos a contaminantes e a uma infecção causada por *Vibrio*.

Capítulo I

Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Policlorobifenis no sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis*

1. Introdução

Existe uma grande diversidade de contaminantes no ambiente marinho entre os quais se destacam como mais perigosos os metais pesados (Coles *et al.*, 1995), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e policlorobifenis (PCBs) devido ao seu comportamento imunossupressivo (Wootton *et al.*, 2003b). Os PAH e PCBs são duas classes de poluentes orgânicos persistentes (POPs) em todo o ambiente e requerem elevada atenção uma vez que as suas propriedades químicas podem causar efeitos cancerígenos e disrupções endócrinas em todos os biotas (Fuoco *et al.*, 2005).

Os PAH são poluentes ubíquos que podem entrar no ambiente marinho de diversas formas, i.e, via precipitação atmosférica, via efluentes industriais e municipais ou via derramamento de petroleiros (Bihari *et al.*, 2007), mas a combustão de matéria orgânica é a maior fonte destes poluentes (Smick *et al.*, 1999). A sua estrutura química estável e a sua baixa solubilidade faz com que estes contaminantes persistam no ambiente durante vários anos e ultimamente têm-se observado elevadas concentrações nos tecidos de organismos marinhos, como mexilhões (Grundy *et al.*, 1996; Gómez-Mendikute *et al.*, 2002). Estes POPs pertencem a uma classe de compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos fundidos (Barreira *et al.*, 2007) e podem formar-se por combustão incompleta de materiais orgânicos (PAH pirogénicos), transformação de materiais biogénicos (PAH pirogénicos), transformação de diversas classes de compostos orgânicos existentes nos solos e sedimentos (PAH diagénicos) e/ou síntese directa através de organismos (PAH biogénicos) (Barreira, 2007).

Fenantreno e Benzo[a]pyreno (B[a]P) são PAH carcinogénicos e mutagénicos que têm sido investigados ao longo das últimas décadas (Garcia-Martinez & Livingstone, 1995). O Fenantreno compõe grande parte do crude, dos derivados de combustão fóssil e pertence a classe dos PAH de baixo peso molecular, com três anéis aromáticos condensados (Fuocu *et al.*, 2005), o que faz com que tenha solubilidade na água e alta toxicidade nos organismos marinhos (Neff & Anderson, 1981). O B[a]P encontra-se na classe dos PAH de elevado peso molecular com cinco anéis aromáticos condensados (Fuocu *et al.*, 2005), que se incorpora nos organismos provocando efeitos tóxicos, genotóxicos e carcinogénicos.

Os PCBs são contaminantes orgânicos prioritários que apresentam uma distribuição por diversas áreas do ambiente em todo o mundo, mas é no ambiente aquático que se tendem a acumular devido ao seu carácter hidrofóbico, baixa solubilidade e persistência (Encomio & Chu, 2000). Constituem uma classe de 209 compostos, denominados de congéneres, com diferentes graus de toxicidade e de actividade biológica devido às diferenças existentes no número e posição dos átomos de cloro (Cardellicchio *et al.*, 2007). Vários estudos laboratoriais têm sido feitos sobre os efeitos deste contaminante em animais e humanos (Ferreira & Vale, 1998; Encomio & Chu, 2000; Fournier *et al.*, 2000; Segre *et al.*, 2002) concluindo-se que os PCB podem funcionar como imunossuppressores ou, ainda, podem afectar o metabolismo lipídico e a reprodução. O mecanismo dos PCBs ainda é uma incerteza, mas está estabelecido que a exposição a este contaminante origina uma diminuição na actividade da proteína kinase C (Kodavanti *et al.*, 1998), altera a estrutura dos linfócitos T (Safe, 1994) e afecta a reprodução (Encomio & Chu, 2000).

Nos últimos anos, vários têm sido os episódios de marés negras na costa Galega devido aos derrames causados por petroleiros, tais como *Andros Patria* (1979), *Aegean Sea* (1992) e *Prestige* (2002). Devido à elevada repercussão económica que a presença destes contaminantes tem no cultivo de mexilhão, este capítulo tem como objectivo mostrar o efeito, *in vitro* e *in vivo*, dos PAH e PCBs nos mecanismos do sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis* para podermos ficar a conhecer como é que estes organismos são capazes de se defender destes episódios.

2. Material e Métodos

2.1 Recolha e tratamento dos animais

Os exemplares de mexilhão do Mediterrâneo, *Mytilus galloprovincialis*, com um tamanho compreendido entre 5-6 cm foram obtidos numa fábrica comercial de marisco (Mariscos Ría de Vigo, S.L) e aclimatizados durante uma semana às condições experimentais em tanques de 25 L. Estes tanques apresentavam circuito aberto, com água do mar filtrada (FSW) a uma temperatura de 15°C e salinidade de 33‰ e os animais foram alimentados diariamente com a microalga *Isochrysis galbana* (12×10^8 célula/animal).

2.2 Tratamento *in vivo* e *in vitro* com PAH e PCBs

Para estudar os efeitos *in vivo* e *in vitro* dos PAH e PCBs nos mecanismos do sistema imune dos exemplares de *M. galloprovincialis* estabeleceram-se 3 grupos, cada grupo com 4 indivíduos. Extraiu-se do músculo aductor posterior de cada indivíduo 1 ml de hemolinfa e agrupou-se o volume resultante da extracção dos 4 animais, de modo a formar um grupo. A concentração de células foi ajustada a $2,5 \times 10^4$ células/ml com FSW e plaquearam-se 100 µl de cada grupo em placas de 96 poços para se poder realizar as experiências. A cada grupo inoculou-se 100 µl das seguintes concentrações de PAH e PCBs (Sigma, Aldrich): nos tratamentos *in vitro* utilizaram-se concentrações de 0, 5, 50 e 100 ppb (partes por bilião) para PAH e 0, 0,35 e 3,5 µg/ml para PCBs; nos *in vivo* as concentrações de ambos os contaminantes foram 0, 10 e 50 ppb ou um volume equivalente de FSW que corresponde aos controlos. As soluções de trabalho utilizadas *in vivo* foram dissolvidas em acetona e posteriormente adicionadas á água do mar existentes nos tanques (circuito fechado e com arejamento).

2.3. Stress Oxidativo dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis*

Para determinar o stress oxidativo dos hemócitos de mexilhão mediu-se a resposta quimioluminescente (QI) na ausência ou presença do imunoestímulo zimosan A (Sigma – Aldrich, Co). A emissão das unidades relativas de QI (url) foi determinada depois da estimulação dos hemócitos com zimosan A e amplificadas pela adição de luminol (Sigma – Aldrich, Co).

Preparou-se uma solução *stock* de luminol de 0,1M em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich- Co) de modo a obter-se a solução trabalho, onde a concentração desta é

de 10^{-4} M. O zimosan A foi fervido a uma temperatura de 100°C , durante 30 minutos e lavado duas vezes em FSW ressuspendendo-se, novamente, em FSW de modo a obter uma solução stock de 20 mg/ml. Esta solução foi diluída na solução trabalho de luminol até se obter uma concentração de 1mg/ml. Depois da hemolinfa ter sido colocada em placas de 96 poços (100 μl /poço) e de ter sido incubada durante 30 minutos a 15°C , adicionou-se a cada poço 50 μl de solução de luminol e 50 μl de solução de zimosan A e luminol (fig. 1). Quando finalizada a adição das soluções nos poços mediu-se a resposta QI através de um luminómetro (Fluoroskan Ascent, Labsystems, Vantaa, Finland) durante seis vezes, com intervalos de 5 minutos e um tempo de integração de 1000 ms em cada medida (ver Anexo I)

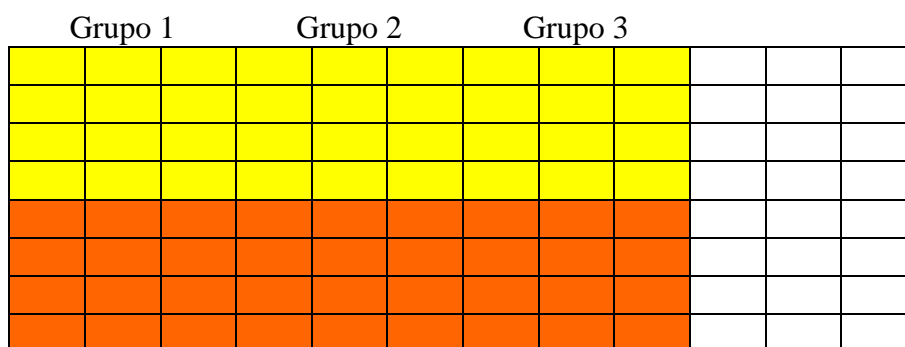


Figura 1 – Desenho experimental da medição de quimioluminescência. A amarelo estão indicados os poços com solução de luminol e a laranja os poços com solução de zimosan A e luminol.

2.4 Análise da produção de NO nos hémocitos de *Mytilus galloprovincialis*

A produção de radicais de azoto nos hemócitos de mexilhão foi determinada através do uso da Reacção de Griees (Green *et al.*, 1982), reacção que quantifica o nitrito presente no sobrenadante. Depois da incubação das células retirou-se 50 μl do sobrenadante de cada poço e foram depositados em novas placas de 96 poços. Nos poços com 50 μl de sobrenadante adicionou-se 100 μl de uma solução de sulfanilamida 1 % (Sigma-Aldrich, Co) e 100 μl de N-naftil-etilendiamina 0,1 % (Sigma-Aldrich, Co), e cada solução foi preparada em 2,5 % de ácido fosfórico.

Determinou-se a absorvância a 540 nm utilizando um espectrofotómetro multiscan (Labsystems, Vantaa, Finland) e a concentração μM de nitrito foi determinada a partir de uma recta padrão obtida de distintas concentrações de nitrato de sódio (100, 50, 25, 10, 5 e 1 μM) (ver Anexo II).

2.5 Fagocitose

A capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão depois de incubados com diferentes doses de PAH e PCBs a diferentes tempos de tratamento foi determinada através de citometria de fluxo usando um *FACS Calibur* (Becton Dickinson, Immunocytometry System, Mountain View, CA, U.S.A).

Adicionou-se uma suspensão de *FluoSpheres* (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, U.S.A.), de 1,2 µm de diâmetro numa proporção de 1:10, aos hemócitos e incubou-se durante duas horas a 15°C. De seguida procedeu-se a eliminação das fluosferas onde se eliminou o sobrenadante e se lavaram as células duas vezes com PBS 1X (tampão salino) antes de se levantar as células com um hisópo. As células foram ressuspensas em 500 µl de PBS 1X e 50 µl de *Trian Blue* filtrado com o objectivo de corar as fluosferas não fagocitadas. Para cada amostra determinaram-se 5000 eventos e mediu-se a fluorescência num canal de emissão FL-1, cujo pico máximo de absorvância foi 530 nm (ver Anexo III).

2.6 Estatística

Os dados obtidos nas experiências foram analisados segundo o teste estatístico t-Student, onde os resultados se expressam da seguinte forma: média ± desvio padrão (DP). Consideram-se alterações significativas estatisticamente aquelas com um valor de $p \leq 0,05$ e em relação ao controlo (0).

3. Resultados

3.1 Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no stress oxidativo

3.1.1 Efeito do Fenantreno

O efeito das diferentes concentrações de Fenantreno no *triggering* (efeito directo) do stress oxidativo não mostrou qualquer alteração significativa na resposta dos hemócitos, no entanto este efeito foi comparado com o produzido quando a resposta é mediada por zimosan A (Fig. 1.1). Na ausência de Phenantreno observa-se o efeito activador do zimosan, como conhecido, enquanto na presença do contaminante o efeito deste é inibido.

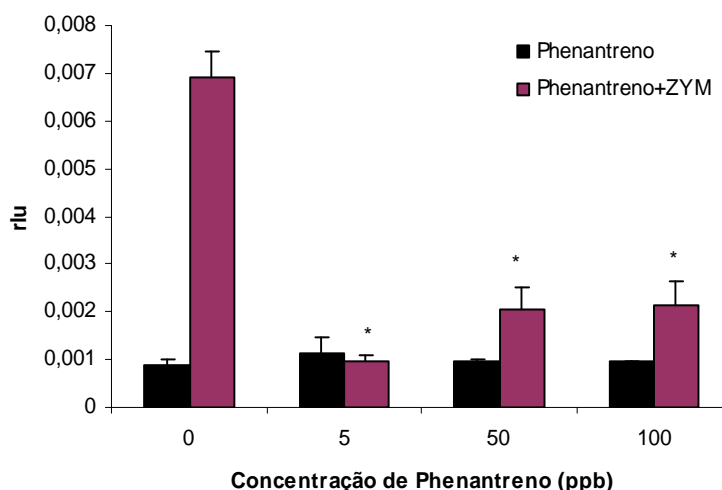


Figura 1.1 – Efeito directo de diferentes concentrações de Fenantreno na resposta Q1 na presença (barras roxas) ou na ausência de zimosan A (barras pretas) nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis*. Valores significativos indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.1.2 Efeito do B[a]P

O efeito directo das distintas concentrações de B[a]P não mostrou alterações significativas na resposta dos hemócitos às concentrações deste PAH em relação ao controlo. Este efeito foi comparado com o obtido quando a resposta é mediada por zimosan A, observando-se o efeito estimulador deste composto na ausência de B[a]P mas à medida que as concentrações de contaminante aumentam o efeito estimulador é inibido (Fig. 1.2)

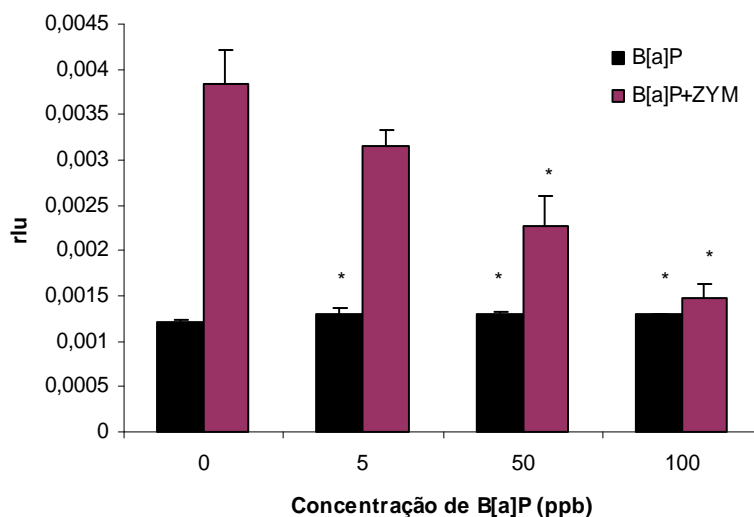


Figura 1.2 – Efeito de diferentes concentrações de B[a]P na resposta Q1 na presença (barras roxas) ou ausência de zimosan A (barras pretas) nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis*. Valores significativos indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.2 Efeito do pré-tratamento *in vitro* e *in vivo* com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no stress oxidativo

3.2.1 Efeito do Fenantreno

O efeito das diferentes concentrações de Fenantreno no stress oxidativo dos hemócitos de mexilhão foi determinado *in vivo* e *in vivo*, mediado ou sem mediar por zimosan A (Figs. 1.3 e 1.4)

No pré tratamento *in vitro* com as diferentes concentrações de Fenantreno, a resposta dos hemócitos a 1 e 3 horas de incubação não mostrou qualquer alteração significativa, no entanto a 6 horas de incubação na presença de elevadas concentrações esta resposta diminui significativamente com respeito ao controlo (Fig. 1.3A). O efeito imunoestimulador do zimosan diminuiu quando os hemócitos foram incubados a 1, 3 e 6 horas com as concentrações de Fenantreno, sendo este efeito dependente da concentração: altas concentrações de Fenantreno produzem um efeito inibidor mais forte (Fig. 1.3B).

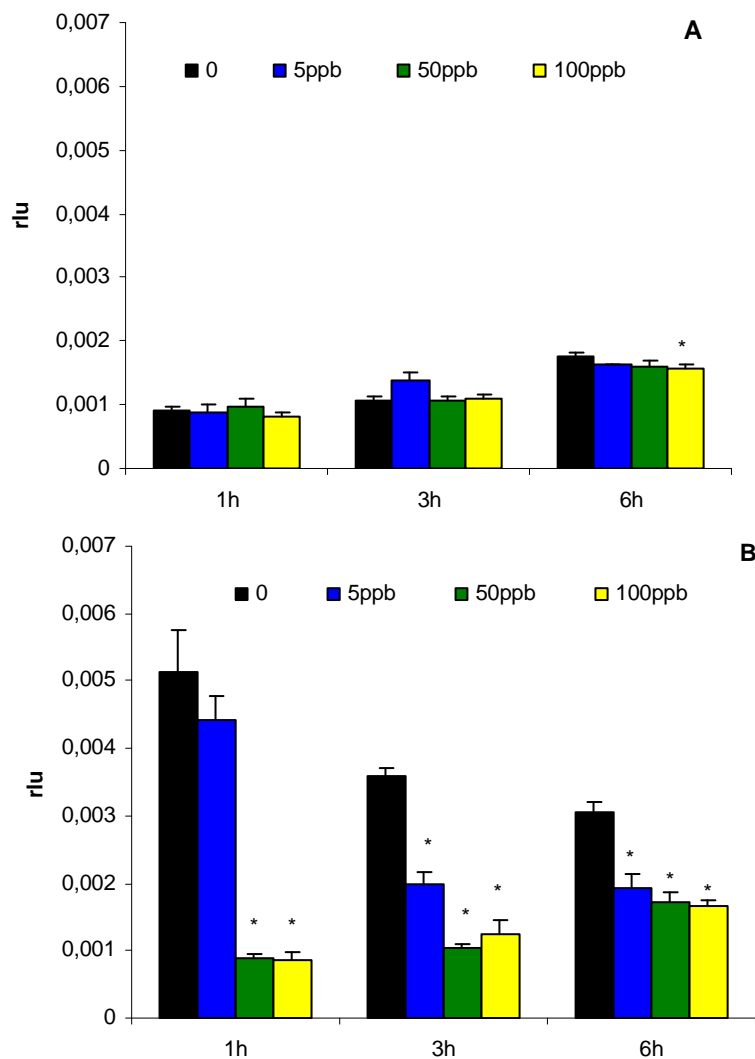


Figura 1.3 – Resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* na ausência (A) e na presença (B) de zimosan A depois do tratamento *in vitro* com distintas concentrações de Fenantreno. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

No pré-tratamento *in vivo* com diferentes doses de Fenantreno observou-se que este contaminante causou um efeito inibidor com respeito ao controlo na resposta dos hemócitos a 3 horas de tratamento sem mediar (Fig. 1.4A). Este efeito, também, foi determinado quando a resposta é mediada por zimosan A verificando-se que o efeito imunoestimulador deste composto diminui na presença de Fenantreno a 6 horas de tratamento (Fig. 1.4B)

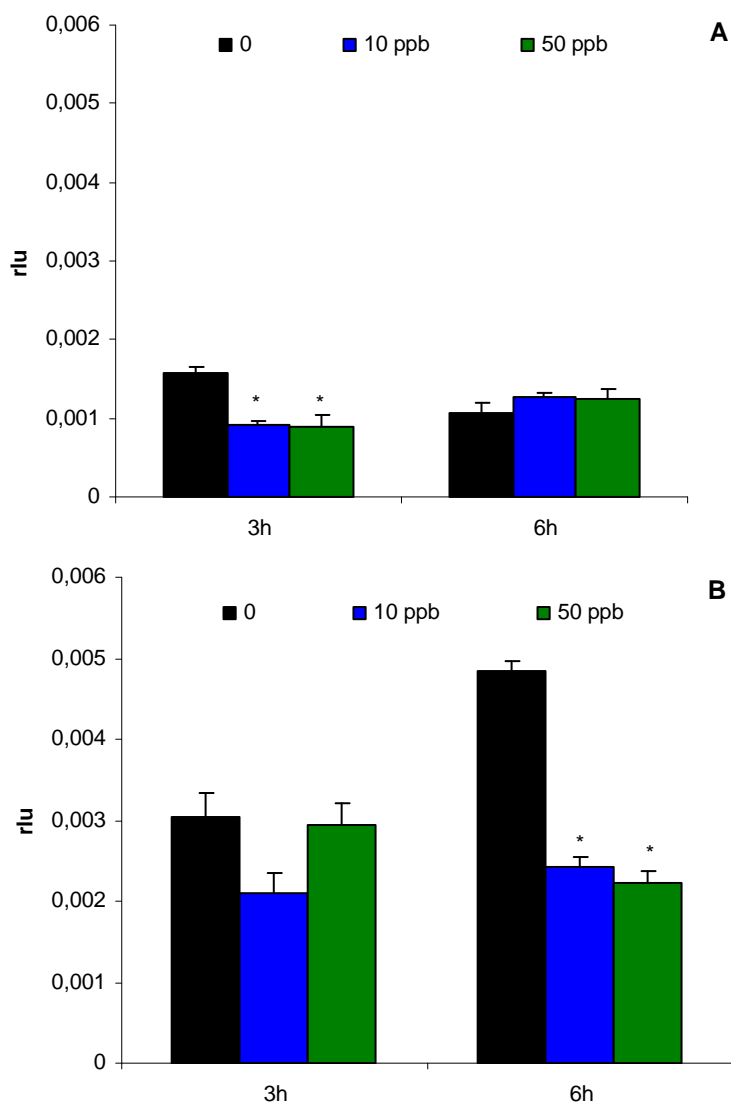


Figura 1.4 – Resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* na ausência (A) e presença (B) de zimosan A depois do tratamento *in vivo* com distintas concentrações de Fenantreno. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.2.2 Efeito do B[a]P

Os hemócitos de mexilhão quando incubados com distintas concentrações de B[a]P a 1 e 6 horas de tratamento não mostraram qualquer alteração na resposta QI, mas quando incubados a 3 horas a sua resposta aumentou na presença de baixas concentrações de B[a]P (Fig. 1.5A). Pelo contrário, quando administrado zimosan A observaram-se várias alterações na resposta dos hemócitos quando tratados com B[a]P. O efeito activador deste estímulo nos hemócitos diminuiu na presença de B[a]P, verificando-se um efeito inibidor mais forte na presença de altas concentrações de B[a]P a 1, 3 e 6 horas (Fig. 1.5B).

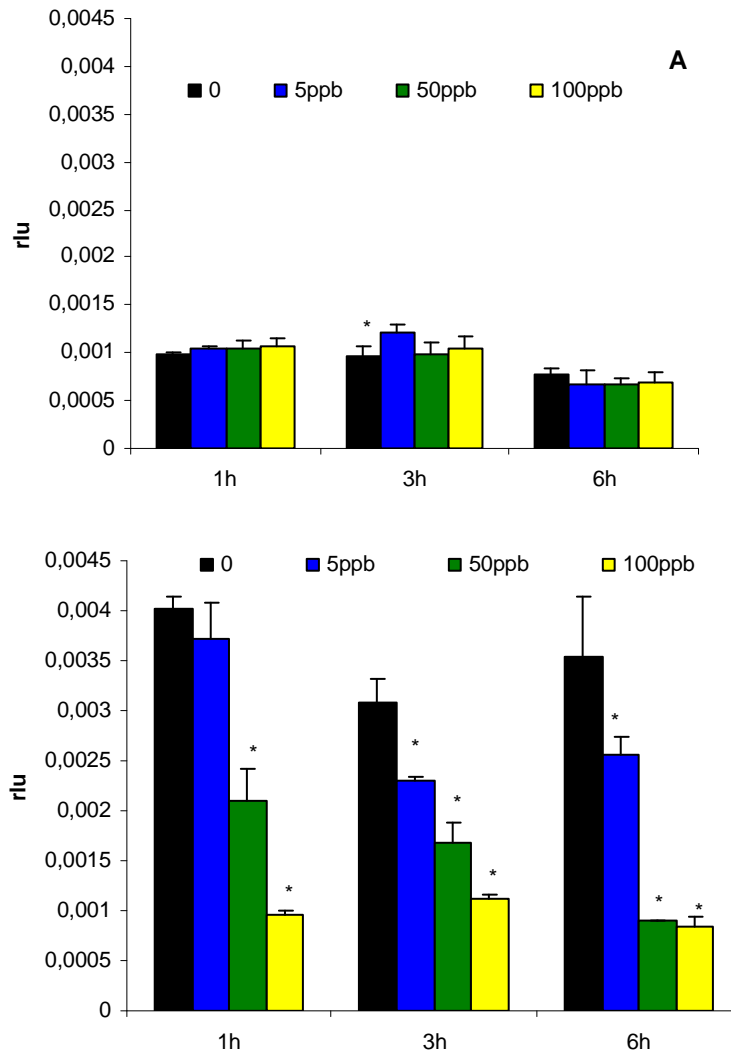


Figura 1.5 – Resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* na ausência (A) e presença (B) de zimosan A depois do tratamento *in vitro* com distintas concentrações de B[a]P. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

Depois do tratamento *in vivo* com B[a]P a resposta dos hemócitos de mexilhão a 3 e 6 horas sem mediar por zimosan A não teve qualquer alteração significativa (Fig. 1.6A), mas quando mediada observaram-se alterações significativas (Fig. 1.6B). A 3 horas de tratamento na presença de concentrações intermédias há um forte aumento na resposta dos hemócitos, no entanto a 6 horas o efeito do zimosan A é inibido por o B[a]P.

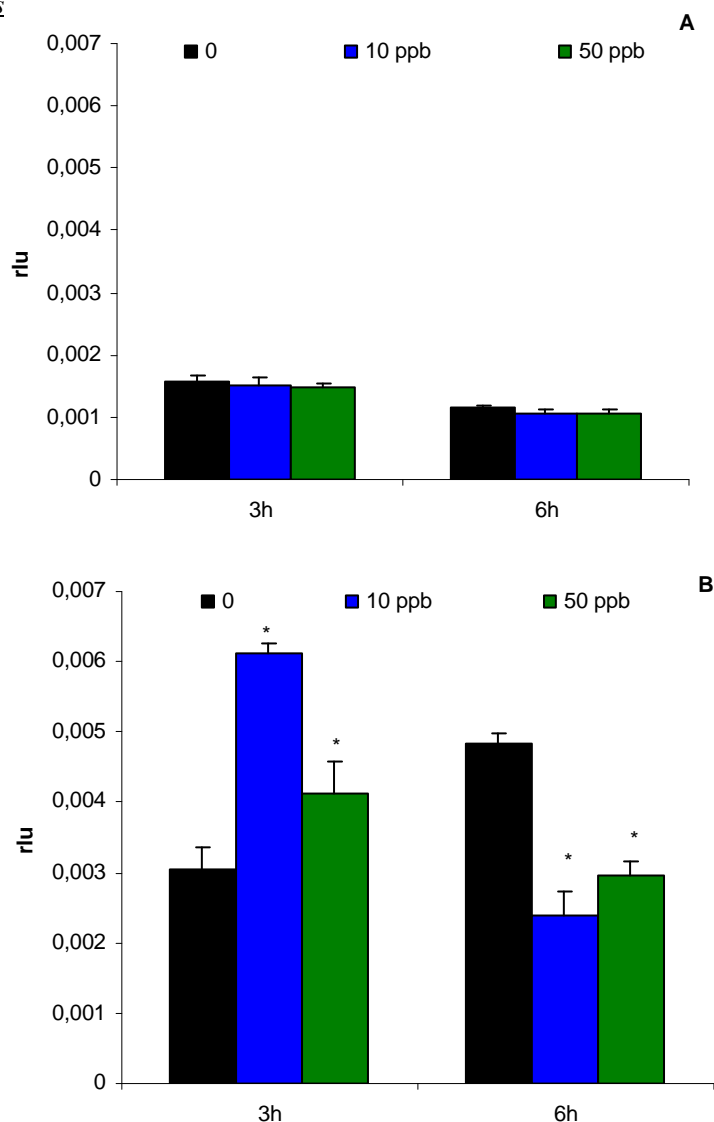


Figura 1.6 – Resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* na ausência (A) e mediada (B) por zimosan A depois do tratamento *in vivo* com distintas concentrações de B[a]P. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.3 Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na produção de NO

3.3.1 Efeito do Fenantreno

A produção de NO foi determinada nos hemócitos de mexilhão depois dos tratamentos *in vitro* e *in vivo* com Fenantreno. Baixas concentrações de Fenantreno causam um aumento significativo na produção de NO nos hemócitos de mexilhão depois de 3 horas de incubação *in vitro* (Fig. 1.7A), no entanto quando tratados *in vivo* a produção de NO é inibida na presença do Fenantreno (Fig. 1.7B).

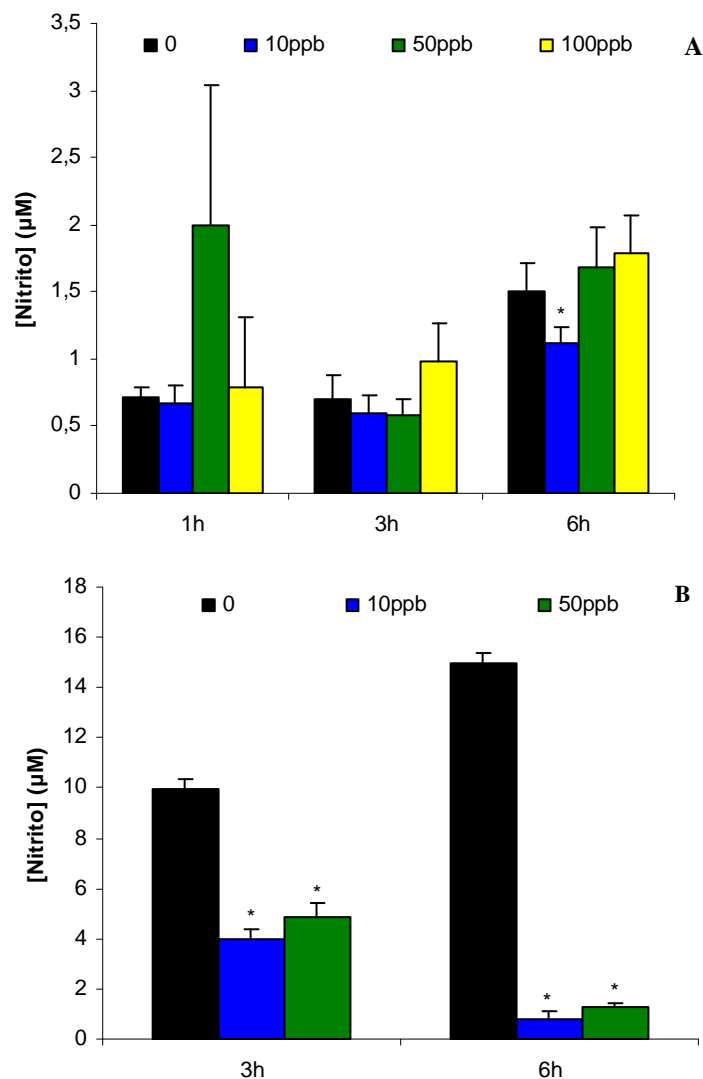


Figura 1.7- Produção de NO nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vitro* (A) e *in vivo* (B) com distintas concentrações de Fenantreno. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.3.2 Efeito do B[a]P

O efeito do B[a]P causou alterações significativas na produção de NO nos hemócitos de mexilhão depois de incubados *in vitro*. Na ausência deste contaminante não houve qualquer alteração na produção de NO, no entanto na presença do mesmo verificou-se um aumento desta produção sendo mais forte a 6 horas de incubação e a concentrações intermédias de B[a]P (Fig. 1.8A). A presença de B[a]P nos hemócitos, depois do tratamento *in vivo*, causou a inibição da produção de NO (Fig. 1.8B).

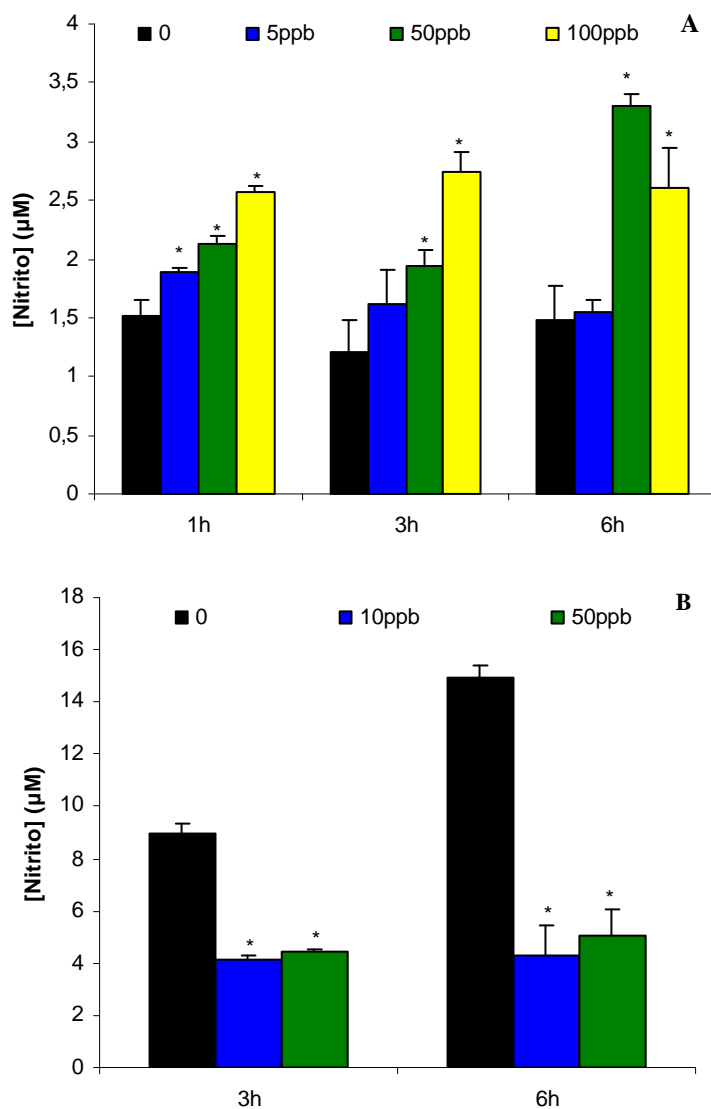


Figura 1.8- Produção de NO nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vitro* (A) e *in vivo* (B) com distintas concentrações de B[a]P. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.4 Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na fagocitose

A percentagem de células que fagocitaram fluosferas nos hemócitos de mexilhão foi determinada depois da sua incubação *in vivo* com distintas concentrações de Fenantreno e B[a]P.

Na figura 1.9A está ilustrado a percentagem de células fagocíticas na presença de Fenantreno e observa-se a diminuição desta à medida que as concentrações de contaminante aumentam. A figura 1.9B mostra a percentagem de células fagocíticas na presença de B[a]P, verificando-se que depois de 3 horas de incubação com contaminante esta percentagem aumenta a medida que a concentração, enquanto que a 6 horas de incubação se verifica o contrário.

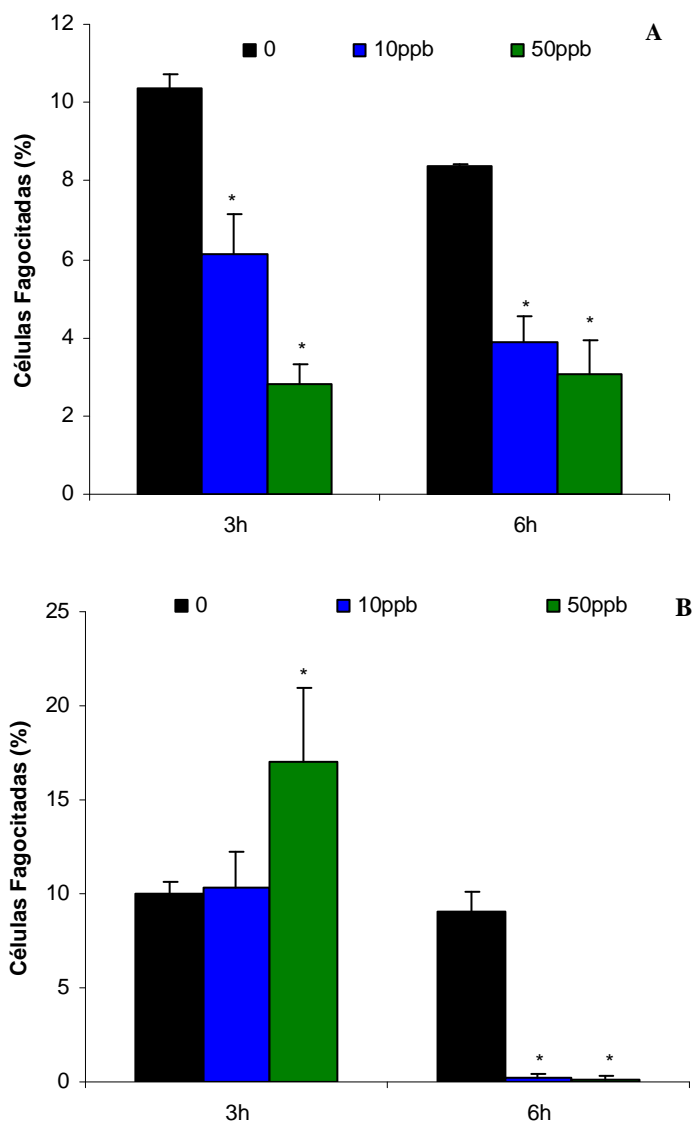


Figura 1.9 – Capacidade fagocítica dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vivo* com distintas concentrações de Fenantreno (A) e B[a]P (B). Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.5 Efeito dos PCBs no stress oxidativo

O efeito das distintas concentrações de PCBs no *triggering* do stress oxidativo não mostrou nenhuma alteração significativa na resposta dos hemócitos de mexilhão. O efeito deste contaminante foi comparado com o produzido quando administrado zimosan A, observando-se que à medida que as concentrações de PCBs aumentam a resposta Q1 é mais forte (Fig.1.10).

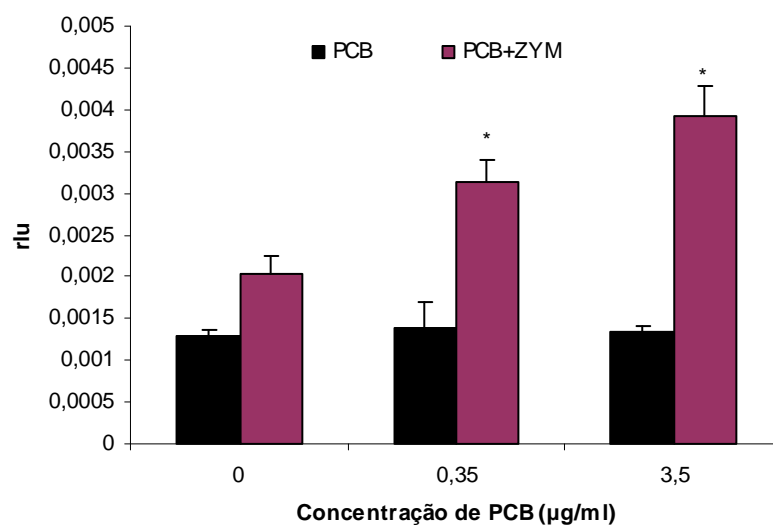
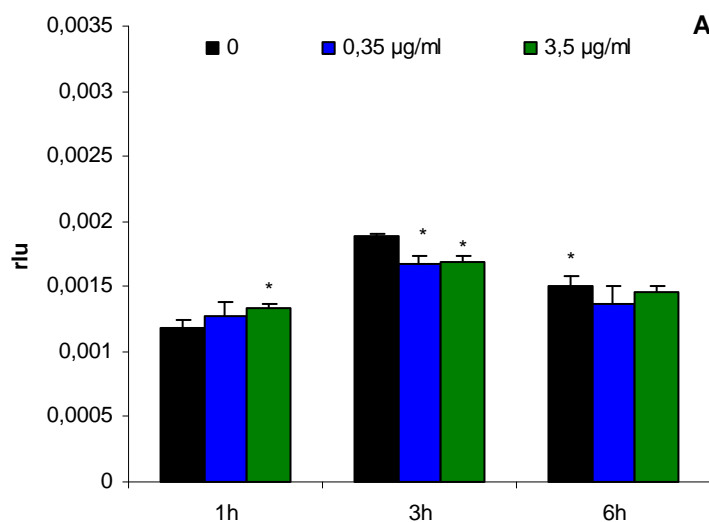


Figura 1.10 - Efeito de diferentes concentrações de PCBs na resposta QI na presença (barras roxas) ou ausência (barras pretas) de zimosan A, nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis*. Valores significativos indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.6 Efeito do pré-tratamento *in vitro* e *in vivo* com PCBs no stress oxidativo

A resposta produzida pelos hemócitos de mexilhão foi medida depois destes terem sido tratados *in vitro* e *in vivo* com diferentes doses de PCBs.

Observou-se que os PCBs *in vitro* causaram alterações significativas em relação ao controlo, verificando-se que em intervalos de tempos curtos, concentrações elevadas de PCBs aumentam a resposta QI dos hemócitos. A 3 e 6 horas observou-se que concentrações intermédias e altas de PCBs provocam aumentos na resposta (Fig. 1.11A). Este efeito foi comparado com o produzido por zimosan A, verificando-se que não há qualquer alteração significativa na resposta dos hemócitos de mexilhão (Fig. 1.11B).



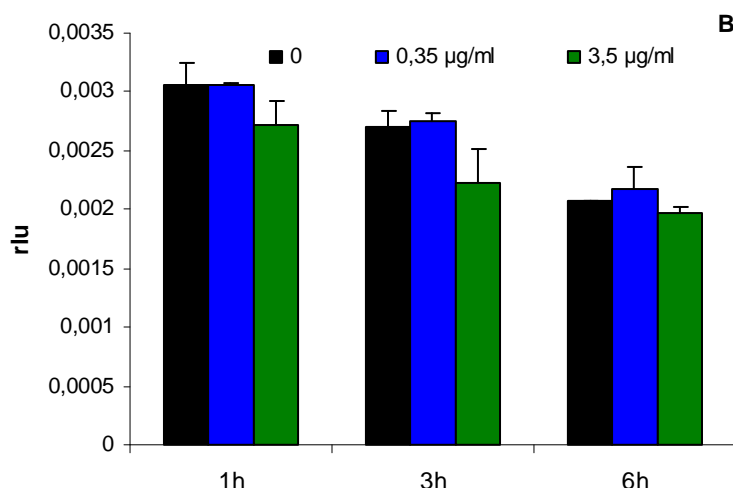
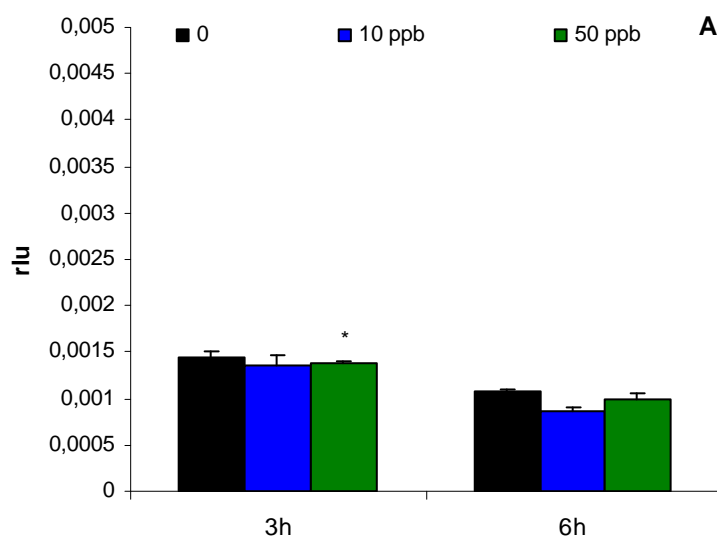


Figura 1.11 – Resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* na ausência (A) ou presença (B) de zimosan A depois do tratamento *in vitro* com distintas concentrações de PCBs. Valores significativos indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

A resposta dos hemócitos de mexilhão sofreu alterações quando tratados com PCBs, observando-se que a 3 horas de incubação *in vivo* a resposta QI aumenta na presença de concentrações altas de contaminante e a 6 horas diminui na presença de baixas concentrações (Fig. 1.12A). Quando esta resposta é mediada por zimosan A verifica-se que o efeito deste composto é inibido a 6 horas de tratamento, sendo uma inibição mais forte a elevadas concentrações de PCBs (Fig. 1.12B)



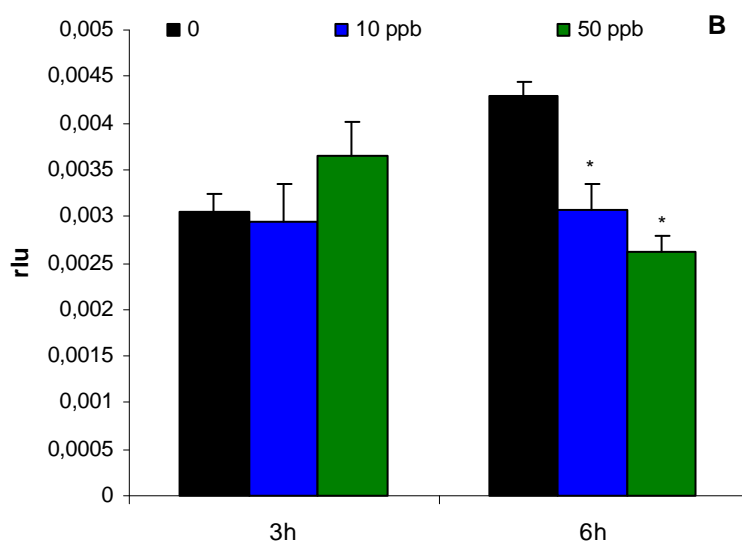
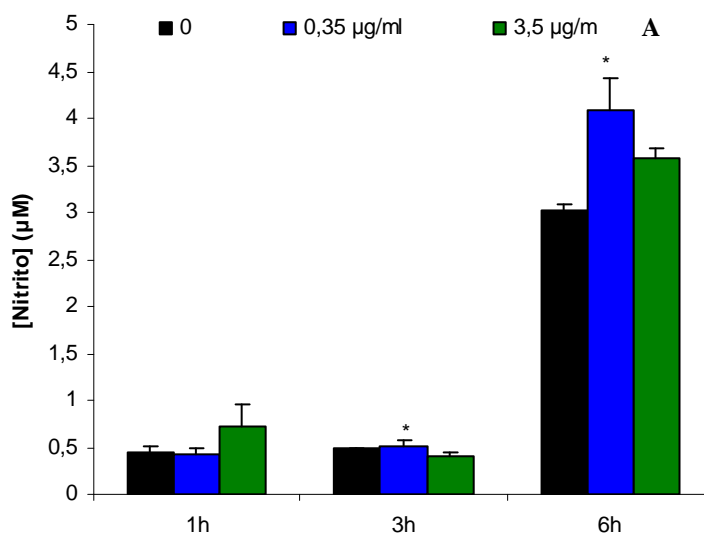


Figura 1.12– Resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* na ausência (A) e presença (B) de zimosan A depois do tratamento *in vivo* com distintas concentrações de PCBs. Valores significativos indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.7 Efeito dos PCBs na produção de NO

A Figura 1.13A mostra o efeito *in vitro* sobre a produção de NO nos hemócitos de mexilhão. A tempos curtos de incubação a produção de NO nos hemócitos não sofreu qualquer alteração, no entanto a 3 e 6 horas de incubação verificou-se que concentrações intermédias e altas de PCBs causam aumentos neste mecanismo.

Na figura 1.13B está ilustrado o efeito *in vivo* das diferentes concentrações de PCBs na produção de NO, observando-se uma diminuição deste mecanismo à medida que as concentrações aumentam.



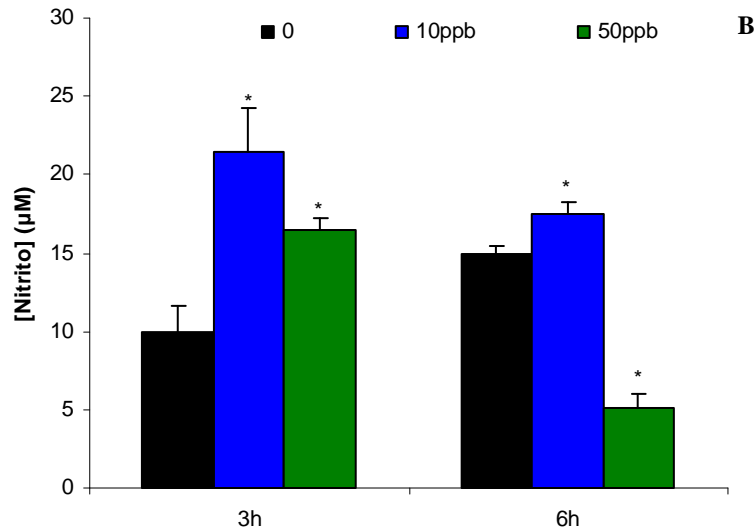


Figura 1.13 - Produção de NO nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vitro* (A) e *in vivo* (B) com distintas concentrações de PCBs. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.8 Efeito dos PCBs na fagocitose

O efeito dos PCBs na capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão foi determinada *in vivo* a 3 e 6 horas de tratamento. A percentagem de células fagocitadas a 3 e 6 horas de incubação diminuiu à medida que as concentrações de PCBs aumentaram, verificando-se que este mecanismo se inibe na presença de concentrações elevadas de contaminante (Fig. 1.14).

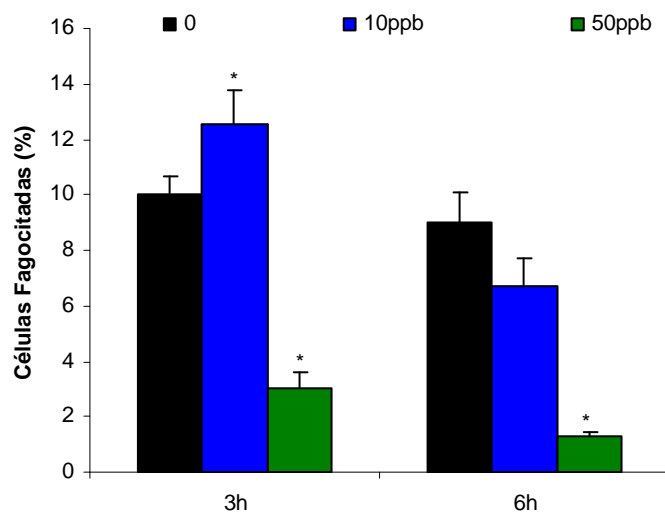


Figura 1.14 – Capacidade fagocítica dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois da incubação *in vivo* com distintas concentrações de PCBs. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

4. Discussão

O ambiente marinho pode ser considerado como a maior via de entrada de contaminantes, via esta que se pode associar a elevadas mortalidades nos biotas e a efeitos fisiológicos em alguns organismos aquáticos (Dyrynda *et al.*, 1998). O sistema imunitário dos mexilhões é um sistema inato constituído por componentes celulares e humorais, sendo os hemócitos as células mais importantes deste sistema. Os hemócitos participam em mecanismos de defesa, como libertação de radicais de oxigénio (ROS), de azoto e fagocitose (Pipe & Coles, 1995) que tem como objectivo principal a defesa do hospedeiro contra o organismo invasor. Este capítulo mostra o efeito directo e indirecto de duas classes de contaminantes prioritários, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH) e Policlorobifenis (PCBs), no sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis* depois do pré-tratamento com concentrações e tempos diferentes.

A exposição de bivalves, quer *in vivo* quer *in vitro*, a diferentes contaminantes tem sido objecto de estudo ao longo do tempo, nomeadamente de mecanismos como a produção de ROS. A resposta QI tem sido a técnica mais utilizada pelos autores e através desta, observou-se que a exposição dos hemócitos a altas concentrações de contaminante inibem esta resposta (Anderson *et al.*, 1994) e baixas concentrações aumentam-na (Larson *et al.*, 1980).

O efeito de Fenantreno e B[a]P na produção de ROS dos hemócitos de mexilhão foi determinado após a sua exposição *in vivo* e *in vitro* através da medição da resposta QI, na presença e ausência do estímulo zimosan A. No que diz respeito aos resultados *in vitro* verificou-se que estes dois PAH não tem qualquer efeito na resposta QI, mas quando esta é mediada por zimosan A na ausência de contaminante o efeito deste estimulador, como conhecido, causou um forte aumento na resposta mas à medida que a concentração aumenta este efeito inibe-se e a resposta diminui. *In vivo*, o Fenantreno a tempos curtos causa uma diminuição desta resposta à medida que as concentrações aumentam, já o B[a]P não tem qualquer efeito. Quando esta resposta é mediada por zimosan A estes dois contaminantes diminuem a resposta, apesar de com Fenantreno este efeito verificar-se a tempos longos. Segundo bibliografia sabe-se que o efeito dos PAH na produção de ROS aumenta à medida que a concentração é maior (Gómez-Mendikute *et al.*, 2002; Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003; Wootton *et al.*, 2003b), no entanto noutros estudos observa-se que elevadas concentrações de PAH inibem a

produção de ROS (Sami *et al.*, 1992) o que corrobora os resultados obtidos no nosso trabalho.

O stress oxidativo é um mecanismo associado à fagocitose que resulta na produção de radicais livres de oxigénio que são moléculas de elevada toxicidade que conseguem destruir organismos invasores (Livingstone *et al.*, 1990). Segundo Pipe (1992), em *Mytilus edulis* os ROS são formados em compartimentos lisossomais dos hemócitos e estes são caracterizados por possuir um elevado potencial de absorção de compostos xenobióticos (Winston *et al.*, 1996). Os PAH são conhecidos por se acumularem em altas concentrações nos tecidos e órgãos dos bivalves, preferencialmente nos lisossomas, causando danos na sua estrutura (Lowe *et al.*, 1995; Nott & Moore, 1987). Assim, supõe-se que o Fenantreno e B[a]P são dois PAH que causam danos na estrutura dos lisossomas de *Mytilus galloprovincialis*, provocando a inibição da produção de ROS à medida que as concentrações de contaminante utilizadas são maiores.

Os PCBs, também, são conhecidos por afectarem os lisossomas, no entanto segundo alguns autores podem (Voei *et al.*, 1998) ou não afectar produção de ROS e a activação de esterase (Gagnaire *et al.*, 2006). Como se observou nos resultados obtidos, os PCBs tiveram um efeito distinto, i.e, no início do stress oxidativo ocorreu um aumento na libertação de ROS na presença de zimosan A enquanto no stress oxidativo só se verificaram alterações na ausência do mesmo. No tratamento *in vivo*, os PCBs mostram um efeito inibidor na produção de ROS quando mediada por zimosan A e a tempos intermédios.

Os resultados obtidos na produção de ROS sugerem que este mecanismo em exemplares de mexilhão do Mediterrâneo, quando expostos a PAH e PCBs, é dependente das concentrações e do tempo de exposição pois quando a concentração é alta o efeito imunoestimulador de zimosan A diminui e chega mesmo a inibir sugerindo uma saturação dos hemócitos por parte destes contaminantes xenobióticos.

A síntese do óxido nítrico (NO), relacionada com a fagocitose, é um mecanismo do sistema imunitário (Tafalla *et al.*, 2002) que se encontra pouco abordado. Estudos realizados por Novas *et al.*, (2007) sugerem que a produção basal de NO nos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* está associada à sazonalidade, em que os picos máximos desta produção se dão no Verão, mas em estudos *in vitro* com a IL-2 dos vertebrados esta produção máxima ocorre no Inverno. Segundo Ottaviani & Franceschi (1997), NO quando associado a outros mediadores moleculares, como citoquinas e moléculas neuro-reactivas, pode ser considerado como um co-orientador das respostas dos invertebrados

na presença de vários tipos de stress. Os resultados obtidos *in vitro* com PAH e PCBs mostram que concentrações intermédias causam aumentos na produção de NO, enquanto *in vivo* este mecanismo é inibido na presença de PAH e elevado na presença de concentrações intermédias de PCBs. Este comportamento causado por estes xenobióticos na produção de NO pode estar associado a uma resposta inflamatória, à estimulação da resposta e a toxicidade de cada composto (Smith *et al.*, 2000).

A fagocitose é o mecanismo predominante no sistema imunitário dos invertebrados e o mais estudado em imunotoxicologia. Vários estudos sobre a exposição de hemócitos de bivalves a diferentes concentrações de contaminantes mostraram que a capacidade fagocítica destas células tende a diminuir à medida que as concentrações de contaminantes aumentam (Fries & Tripp, 1980; Anderson *et al.*, 1981; Sami *et al.*, 1992; Cajaraville *et al.*, 1996; Wootton *et al.*, 2003b; Órdas *et al.*, 2007), o que corrobora os resultados obtidos. Isto significa que o Fenantreno, B[a]P e PCBs causaram a diminuição e mesmo inibição da fagocitose à medida que as concentrações eram mais altas e o tempo de exposição mais longo. Os PAH são conhecidos como disruptores membranares (Pipe & Moore, 1986; Nott & Moore, 1987) e como a fagocitose é um mecanismo que se encontra dependente do funcionamento das membranas celulares supõe-se que estas se encontram destabilizadas ou mesmo com danos na sua estrutura, podendo sofrer alterações e até não se realizar. Um estudo recente demonstrou que a diminuição da actividade fagocítica pode estar relacionada com a época de postura em *Mytilus edulis* uma vez que o aumento de esteróides durante a desova pode ter um efeito supressivo na fagocitose (Cartier *et al.*, 2004). Os PCBs também são conhecidos por afectarem a reprodução o que nos faz pensar que esta característica dos PCBs mais o aumento de esteróides durante a postura pode ter influenciado a fagocitose nos nossos organismos uma vez que estes se encontravam em época de postura.

A produção de ROS (Adema *et al.*, 1991), de radicais de azoto (Roch, 1999) e a fagocitose (Bacheré *et al.*, 1995) são mecanismos do sistema imunitário dos bivalves que se encontram associados entre si, podendo ser modulados positiva ou negativamente pois estes dependem das suas características, da concentração e tempo de exposição. O trabalho mostrou uma modulação negativa por parte dos PAH e PCBs nos 3 mecanismos estudados do sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis* visto que: o efeito estimulante do zimosan A na produção de ROS foi inibido; a resposta QI diminuiu assim como a produção de NO e a capacidade fagocítica. Pode-se ainda dizer

que nos tratamentos *in vitro* com PAH a produção NO funcionou como um mecanismo compensatório, i.e, quando a libertação de ROS é inibida a produção de NO aumenta.

Com este trabalho, concluiu-se que os mecanismos do sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis* quando sujeitos a distintas concentrações de PAH e PCBs e tempos distintos sofrem alterações deixando estes organismos debilitados contra outros patógenos. Apesar de ser um tema já estudado acho que seria necessário realizar um estudo minucioso sobre todo o sistema imunitário de várias espécies de bivalves e dentro da mesma espécie mas em locais diferentes, visto que um exemplar de *Mytilus galloprovincialis* cultivado nas rias galegas apresenta uma resposta imune diferente de um cultivado em Portugal.

Capítulo II

Efeito dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Policlorobifenis no sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis* frente a uma infecção experimental com *Vibrio alginolyticus*

1. Introdução

O cultivo de mexilhão nas Rias Galegas tem ao longo das últimas décadas obtido um elevado crescimento, alcançando níveis de produção e de importância económica. Apesar das Rias Galegas oferecerem umas óptimas condições para o cultivo de *Mytilus galloprovincialis* em *bateas*, também sofrem de um vasto leque de contaminantes devido ao elevado tráfego marítimo existente nesta zona (González-Laxe, 2004). Segundo alguns estudos feitos quer em áreas contaminadas, quer em laboratório observou-se que existe uma relação entre a poluição e organismos patógenos, i.e., organismos aquáticos expostos a contaminantes encontram-se mais susceptíveis à propagação de doenças infecciosas provocadas por bactérias e outros organismos (Chu & Hale, 1994; Pipe & Coles, 1995; Parry & Pipe, 2004).

O sedentarismo e a longevidade são duas características dos exemplares do género *Mytilus* que em conjunto com o seu modo de alimentação (filtradores) e a sua distribuição por todo o ambiente marinho potenciam a enorme capacidade de exposição e acumulação de contaminantes, como PAH (Wootton *et al.*, 2003b), PCBs (Encomio & Chu, 2000) e metais. Durante a sua alimentação estes animais podem filtrar grandes quantidades de água, de matéria particulada, e há contaminantes que têm grande afinidade com a matéria particulada e bactérias que podem funcionar como uma proporção substancial de carbono e azoto (McHenery & Birkbeck, 1986) ou como imunossupressores (Parry & Pipe, 2004).

As bactérias do género *Vibrio* encontram-se distribuídas por todo o mundo, preferencialmente em águas marinhas e estuarinas, e fazem parte da alimentação de alguns organismos aquáticos. As espécies deste género são conhecidas por causarem a vibriose, que é a doença mais importante nas culturas de estados larvares de mexilhões mas raramente está associada a episódios de grandes mortalidades (Pipe & Coles, 1995; Gómez-Leon *et al.*, 2005). A diminuição da infecção por parte desta bactéria está relacionada com a idade e com o desenvolvimento do sistema imunitário dos mexilhões, no entanto a presença de contaminantes pode aumentar a susceptibilidade de infecções nos organismos adultos. O sistema imunitário dos bivalves é a principal defesa contra estas bactérias e contaminantes, funcionando através de mecanismos como a produção de ROIs, libertação de enzimas degradativas, de radicais de NO e da capacidade fagocítica das células sanguíneas, os hemócitos.

Como descrito no capítulo anterior, diferentes contaminantes parecem modular a resposta imunitária do mexilhão o que sugere que em função da concentração de contaminante aplicado à água, esta espécie responde de várias maneiras. Com o objectivo de ver se os contaminantes podem aumentar a susceptibilidade do mexilhão a infecções bacteriana, neste capítulo vamos determinar o efeito de Fenantreno, B[a]P e PCBs na produção de ROS, de NO e na capacidade fagocítica dos hemócitos de exemplares de *Mytilus galloprovincialis* frente a uma infecção experimental produzida por *Vibrio alginolyticus*. Esta espécie de *Vibrio* faz parte da flora marinha e durante períodos de Verão pode-se encontrar em elevadas concentrações nos moluscos de modo a causar doenças nos humanos (Pruzzo *et al.*, 2005). Realizou-se, também, um estudo para ver qual a taxa de mortalidade de mexilhões da Praia de Alcabre (situada na Ria de Vigo) quando expostos durante 7 dias a duas concentrações (10 e 50 ppb) de cada contaminante e 10 dias expostos à bactéria.

2. Materiais e Métodos

2.1 Recolha e manutenção dos animais

Os exemplares de *Mytilus galloprovincialis* foram obtidos numa Fábrica Comercial situada na Ria de Vigo (Mariscos Ría de Vigo, S.L) e na praia de Alcabre. Os mexilhões da fábrica comercial, de tamanho compreendido entre 5-6 cm, foram utilizados para estudar os mecanismos do sistema imune, enquanto que os da praia de Alcabre, com cerca de 1-2 cm de comprimento, serviram para ver a taxa de mortalidade quando expostos às condições experimentais. A aclimação destes animais foi feita sob as mesmas condições descritas no capítulo I, na secção dos Materiais e Métodos.

2.2 Preparação dos estímulos

Realizaram-se estudos *in vivo* com diferentes contaminantes, PAH e PCBs e um tipo de bactéria viva, *Vibrio alginolyticus*. As soluções de cada contaminante prepararam-se através de uma solução *stock* de modo a obter uma concentração final de 10 e 50 ppb, enquanto que a bactéria cresceu num meio TSA com NaCl a 1% à temperatura ambiente durante a noite toda. Depois da bactéria crescida retirou-se um pouco deste cultivo e ressuspendeu-se em FSW obtendo a solução *stock* de *Vibrio alginolyticus*. A solução *stock* foi diluída até se obter uma solução de DO de 0,033.

2.3 Tratamento *in vivo*

Para determinar o efeito dos diferentes contaminantes e da bactéria no sistema imune de *Mytilus galloprovincialis* realizaram-se experiências *in vivo*, onde foram utilizadas diferentes concentrações de PAH e PCBs e de *Vibrio alginolyticus*. Inoculou-se 10 e 50 ppb de Fenantreno, B[a]P e PCBs em tanques distintos, cada tanque com 52 animais (40 para a mortalidade e 12 para os parâmetros funcionais), e o mesmo volume de FSW que serviu como controlo. Inoculou-se 100 µl de bactéria por mexilhão intramuscularmente e deixaram-se estes 10 minutos fora de água depois da inoculação. .

Passado 3 horas de inoculação com *Vibrio alginolyticus* e sete dias de exposição a contaminantes procedeu-se à extracção da hemolinfa do músculo aductor utilizando uma agulha estéril. Ajustou-se a concentração da hemolinfa a $2,5 \times 10^4$ célula/ml utilizando FSW e pipetou-se 100 µl de cada grupo numa placa de 96 poços para medir a produção de ROIs e de NO, e uma placa de 24 poços para medir a fagocitose.

2.4 Stress oxidativo

A libertação de ROS na actividade do stress oxidativo dos hemócitos dos exemplares de mexilhão foi determinada através da medição da resposta quimioluminescente (QI), como descrito no capítulo I na secção dos Materiais e Métodos (ver Anexo I).

2.5 Produção de NO

A produção de radicais de NO nos hemócitos de mexilhão foi medida através da reacção de Griess (Green *et al*, 1982) como explicado no capítulo I na secção dos Materiais e Métodos (ver Anexo II).

2.6 Fagocitose

A metodologia utilizada para medir a percentagem de células fagocíticas de bolas de látex foi a mesma utilizada no capítulo I na secção dos Materiais e Métodos (ver Anexo III)

2.7 Mortalidade

A taxa de mortalidade foi determinada em indivíduos recolhidos na praia de Arouca com 2-3 cm de comprimento. Os indivíduos foram expostos durante 7 dias a diferentes concentrações de Fenantreno, B[a]P e PCBs em tanques de circuito fechado, com arejamento e sem alimento. Passados 7 dias de exposição a contaminantes procedeu-se a inoculação de *Vibrio alginolyticus* no músculo aductor de cada mexilhão, com intervalos de 5 minutos para os indivíduos não expelirem a bactéria. Os mexilhões ficaram 10 dias expostos a bactéria e contaminantes em tanques de circuito fechado para se poder determinar a taxa de mortalidade.

2.8 Estatística

Todos os resultados obtidos nas experiências *in vivo* analisaram-se através do teste estatístico t-Student. Os valores significativos obtidos são em relação ao controlo de cada experiência com um valor de $p \leq 0,05$ e representam-se como a média \pm desvio padrão (DP).

3 Resultados

3.1 Efeito dos PAH e de *Vibrio alginolyticus* no stress oxidativo

3.1.1 Efeito do Fenantreno

A figura 2.1 mostra o efeito do Fenantreno na resposta QI dos hemócitos de mexilhão durante uma infecção experimental com *Vibrio alginolyticus*. O Fenantreno causou um aumento da resposta QI nos animais expostos a *Vibrio*, enquanto nos não expostos diminuiu (Fig. 2.1A). Quando a resposta é mediada por zimosan A continua a existir alterações na resposta QI, mas nos animais com infecção concentrações intermédias de Fenantreno provocam um forte aumento no efeito estimulante de zimosan A (Fig. 2.1B)

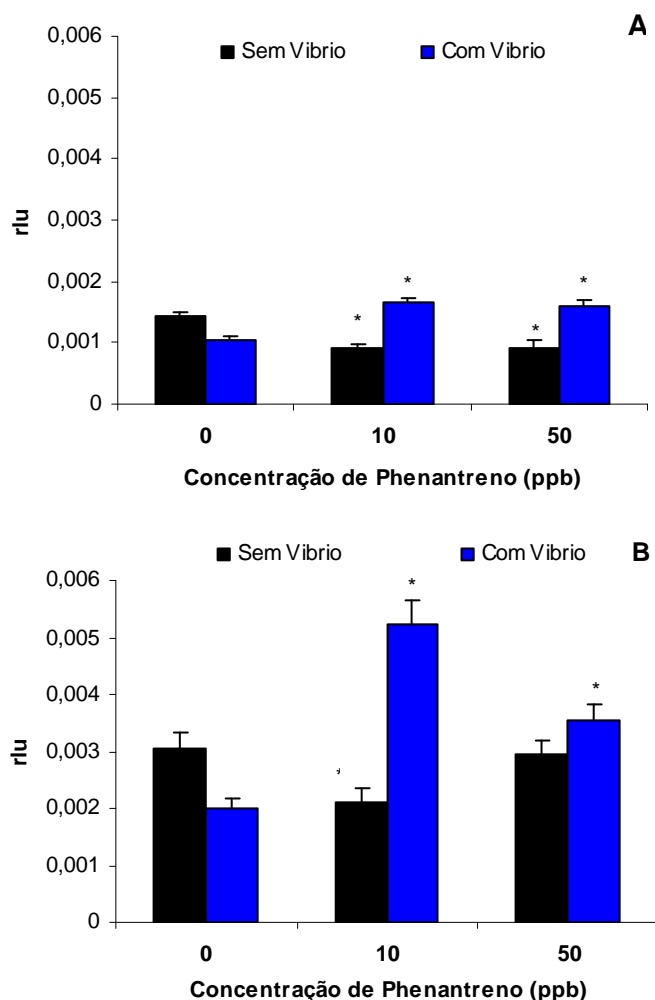


Figura 2.1 – Efeito de Fenantreno na resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* não ausência (A) e presença (B) de zimosan A com (barras azuis) sem (barras negras) *Vibrio alginolyticus*. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.1.2 Efeito do B[a]P

Na figura 2.2 observa-se o efeito de B[a]P na resposta QI dos hemócitos de mexilhão frente a uma infecção. Determinou-se a resposta QI mediada e sem mediada por zimosan A verificando-se que quando não é mediada o B[a]P por si só não tem qualquer efeito, quer nos animais infectados quer nos não infectados (Fig. 2.2A). Na presença de zimosan A, concentrações altas de B[a]P aumentam a resposta QI dos hemócitos de animais infectados (Fig. 2.2B).

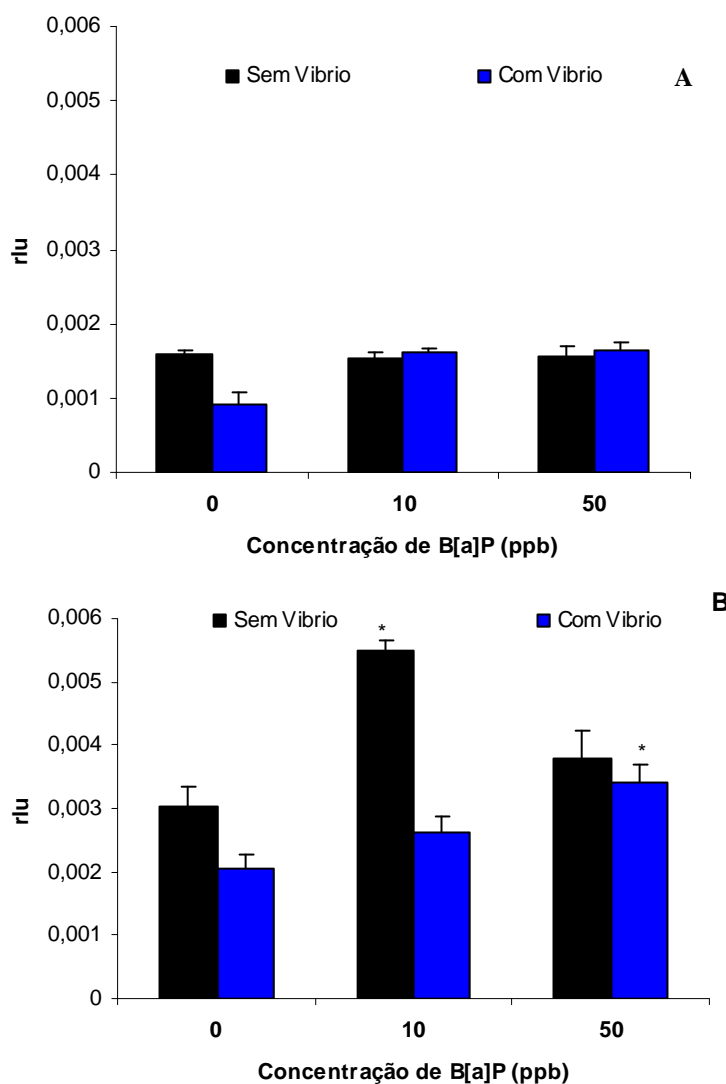


Figura 2.2 – Efeito do B[a]P na resposta QI dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* não mediada (**A**) e mediada (**B**) por zimosan A com (barras azuis) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus*. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.2 Efeito dos PAH e de *Vibrio alginolyticus* na produção de NO

3.2.1 Efeito do Fenantreno

A figura seguinte mostra o efeito da inoculação de *Vibrio* nos hemócitos de mexilhão na presença de distintas concentrações de Fenantreno. Este não tem efeito na produção de NO nos hemócitos de animais infectados, mas na ausência de infecção já se verifica um aumento da produção à medida que Fenantreno aumenta.

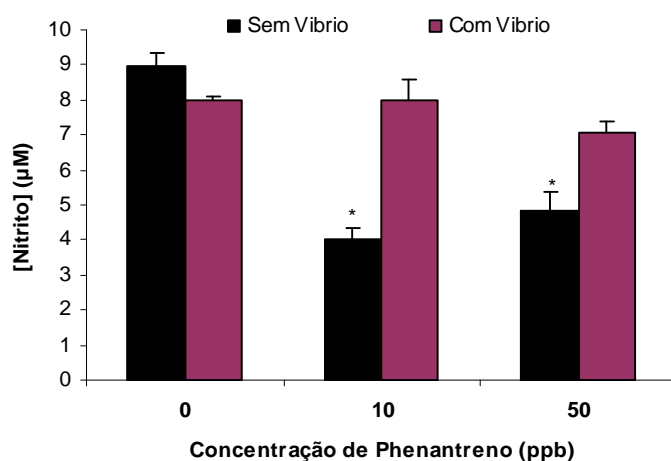


Figura 2.3 – Produção de NO nos hemócitos de mexilhão com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus* e de expostos a Phenantreno. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.2.2 Efeito do B[a]P

O efeito do B[a]P na produção de NO nos hemócitos de exemplares de mexilhão infectados ou não infectados com *Vibrio* está ilustrado na figura 2.4. Concentrações intermédias de B[a]P provocam uma elevada produção de NO em animais infectados, enquanto que em não infectados esta diminui.

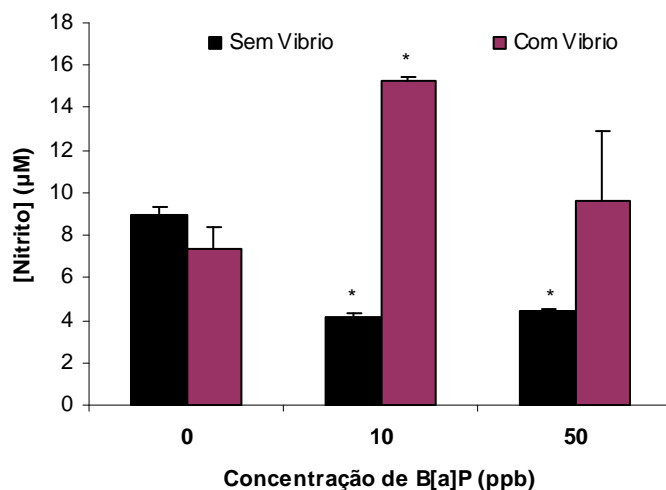


Figura 2.4 - Produção de NO nos hemócitos de mexilhão depois de inoculados com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus* e de expostos a B[a]P. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.3 Efeito dos PAH e *Vibrio alginolyticus* na fagocitose

3.3.1 Efeito do Fenantreno

A figura 2.5 mostra que o Fenantreno, em organismos não infectados, causa uma diminuição na percentagem de células que fagocitam as bolas de látex, enquanto que em organismos infectados não causa qualquer alteração significativa.

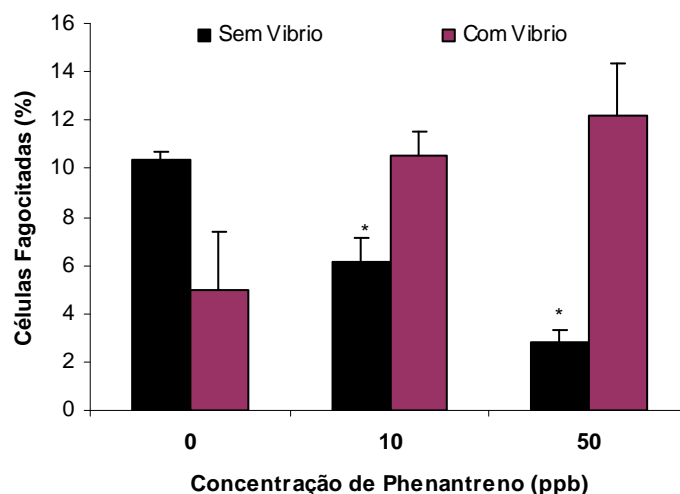


Figura 2.5 – Capacidade fagocítica dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vivo* com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus* e Fenantreno. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.3.2 Efeito do B[a]P

Concentrações intermédias de B[a]P em hemócitos de mexilhão infectados com *Vibrio* causam um aumento na percentagem de células fagocíticas, mas em mexilhões não infectados esta percentagem aumenta com o aumento das concentrações de B[a]P (fig. 2.6)

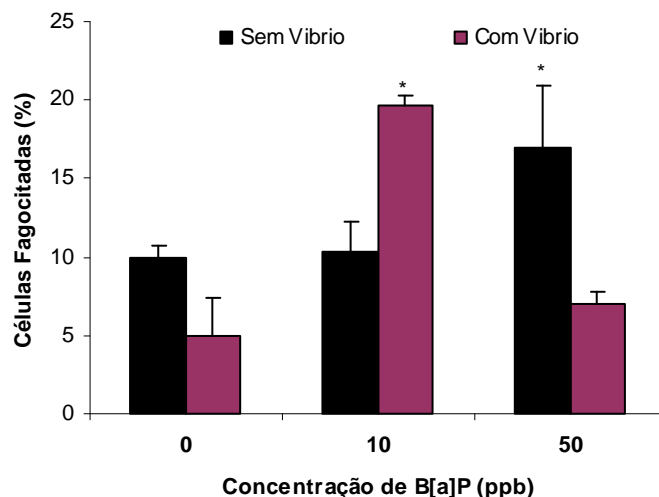
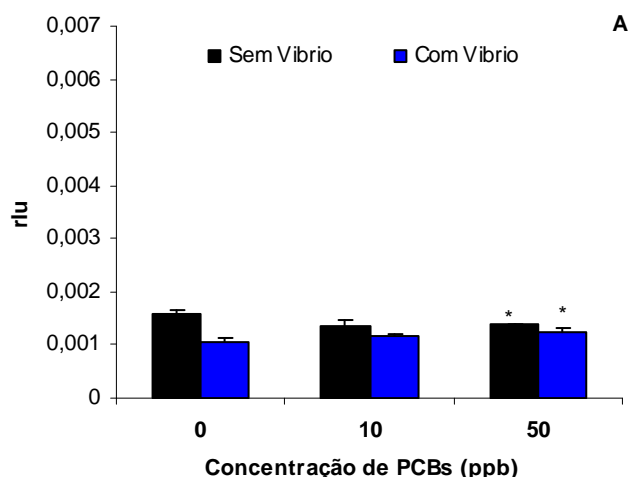


Figura 2.6 - Capacidade fagocítica dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vivo* com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus* e B[a]P. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.4 Efeito dos PCBs e *Vibrio alginolyticus* no stress oxidativo

A resposta Q1 dos hemócitos de mexilhão foi determinada depois de estes serem expostos a distintas doses de PCBs e sujeitos a uma infecção experimental. Quando a resposta não é mediada por zimosan A, concentrações altas de PCBs causam o aumento da resposta Q1, quer em animais infectados ou não infectados (fig. 2.7A). Na presença de zimosan A só os hemócitos dos animais infectados apresentavam um aumento da resposta Q1 causada por concentrações intermédias de PCBs (Fig. 2.7B).



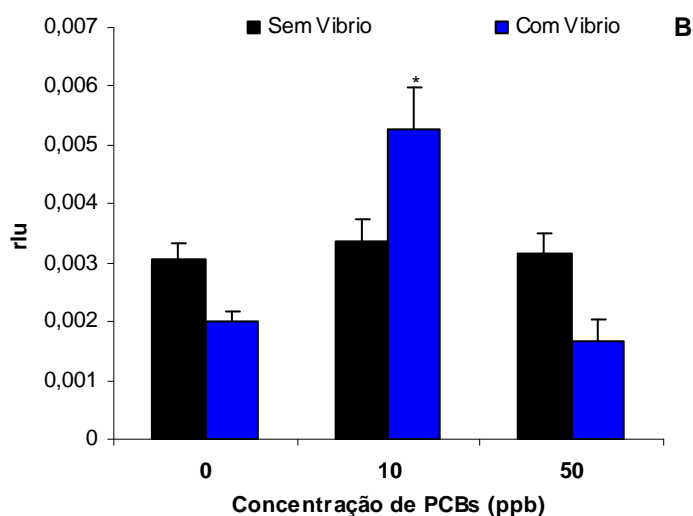


Figura 2.7 - Efeito de PCBs na resposta Q1 dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* não mediada (A) e mediada (B) por zimosan A com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus*. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.5 Efeito dos PCBs e *Vibrio alginolyticus* na produção de NO

Hemócitos de mexilhão infectados e expostos a concentrações intermédias de PCBs mostram uma diminuição significativa na produção de NO, mas em hemócitos de mexilhões não infectados ocorrem alterações significativas apesar de serem mais fortes na presença de concentrações intermédias de PCBs.

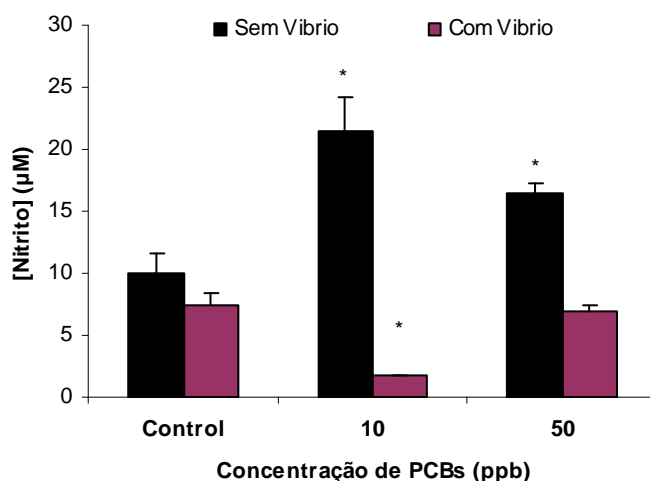


Figura 2.8 – Produção de NO nos hemócitos de mexilhão depois de inoculados com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus* e de expostos a PCBs. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.6 Efeito dos PCBs e *Vibrio alginolyticus* na fagocitose

A capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão não infectados e expostos a PCBs diminui, mas, como em hemócitos de animais infectados, concentrações intermédias deste contaminante aumentam a percentagem de células fagocíticas (Fig. 2.9).

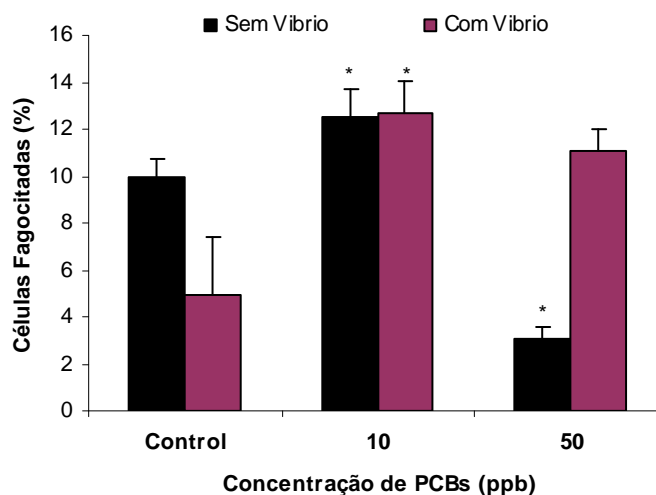
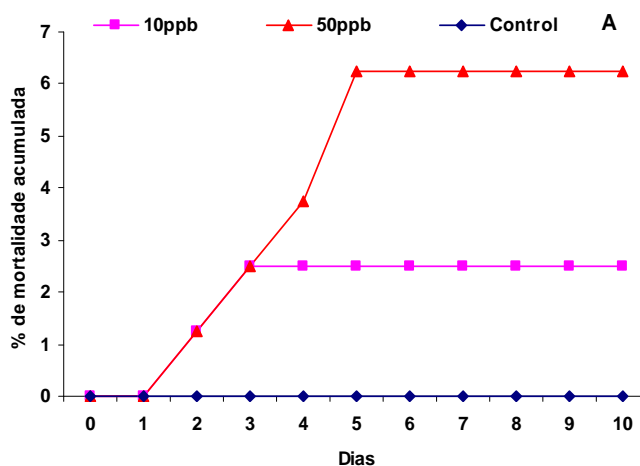


Figura 2.9 - Capacidade fagocítica dos hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* depois do tratamento *in vivo* com (barras roxas) e sem (barras pretas) *Vibrio alginolyticus* e B[a]P. Valores significativos em relação ao controlo indicados por (*) ($p \leq 0,05$, t-Student).

3.7 Taxa de mortalidade

Exemplares de mexilhões recolhidos na praia de Alcabre foram sujeitos 7 dias a duas concentrações de PAH e PCB (10 e 50 ppb) e a uma infecção experimental por *Vibrio alginolyticus* durante 10 dias. A figura 2.10 mostra o efeito destas condições na taxa de mortalidade observando-se que tanto o Fenantreno (A), B[a]P e PCBs não causam mortalidades elevadas sendo o B[a]P o com maior percentagem de animais mortos.



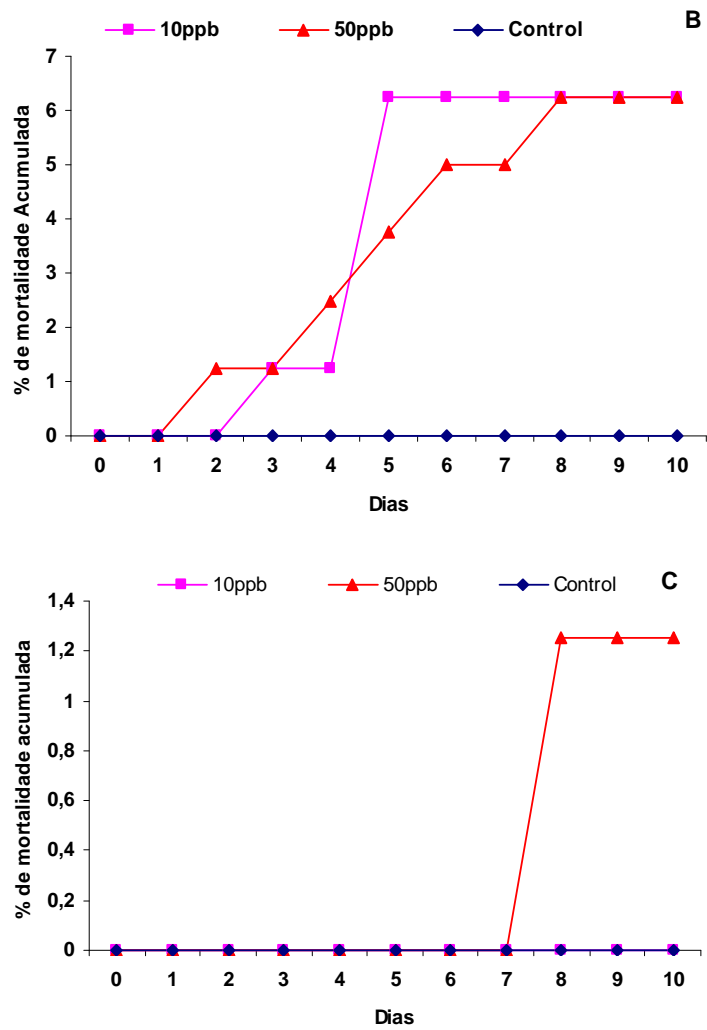


Figura 2.10 – Taxa de mortalidade acumulada de *Mytilus galloprovincialis* infectados com *Vibrio alginolyticus* e expostos a Fenantreno (A), B[a]P (B) e PCBs (C).

4. Discussão

A interacção entre contaminantes existentes no ambiente marinho e o sistema imunitário dos bivalves é um tema que tem ganho importância ao longo do tempo, uma vez que os episódios de marés negras em algumas zonas costeiras são uma constante. Esta interacção suscitou uma dúvida entre vários investigadores, dúvida esta que especulava que os organismos expostos a contaminantes eram mais susceptíveis à entrada de patógenos (Anderson *et al.*, 1981b; Livingstone & Pipe, 1992; Sinderman, 1993).

Pipe & Coles (1995), mostraram que os contaminantes ambientais conseguiam influenciar os mecanismos do sistema imunitário de *Mytilus edulis* e ao mesmo tempo aumentavam a susceptibilidade a doenças infecciosas. No entanto, não há relatos de mortalidades elevadas em cultivos de bivalves sujeitos a estas condições, o que sugere que mecanismos como a produção de ROS (Pipe, 1992), de azoto (Roch, 1999) e fagocitose (Bachère *et al.*, 1995) são eficazes contra todas as partículas que os animais reconheçam como estranhas. Neste capítulo irá ser mostrado os efeitos de Fenantreno, B[a]P e PCBs no sistema imunitário de *Mytilus galloprovincialis* infectados e não infectados com *Vibrio alginolyticus*, e ainda, ver qual a taxa de mortalidade de exemplares de mexilhão em estado larvar (2 cm de comprimento).

O estudo da produção de ROS em hemócitos de mexilhão infectados e não infectados, sujeitos a contaminantes, determinou-se através da medição da resposta QI mediada e sem mediar por zimosan A. O Fenantreno causou um aumento da resposta QI em animais infectados e uma diminuição em não infectados e o B[a]P não provocou qualquer efeito significativo na resposta dos hemócitos. Quando esta é mediada pelo zimosan A alterações significativas em relação ao controlo observam-se, verificando-se que concentrações intermédias de Phenantreno e elevadas de B[a]P aumentam a resposta nos animais infectados. Concentrações altas de PCBs, em organismos infectados e não infectados, aumentaram a resposta QI mas na presença de zimosan A só concentrações intermédias deste contaminante estimulam esta resposta em infectados. Pode-se dizer que em mexilhões infectados com *Vibrio* há sempre estimulação da resposta QI, logo da produção de ROS, mas esta é mais propícia quando os mexilhões se encontram expostos a concentrações intermédias de contaminantes. O aumento do número de hemócitos em bivalves é um dos maiores efeitos causados por

contaminantes durante uma infecção experimental (Noël *et al.*, 1993; Pipe *et al.*, 1995). Em exemplares de *Mytilus edulis*, os eosinófilos são o tipo de hemócitos com maior capacidade de produzir ROS, assim supõe-se que durante o tempo de contaminação e incubação com bactéria os nossos mexilhões aumentaram o número de hemócitos e, ainda, a probabilidade destes serem eosinófilos. Para se poder confirmar esta hipótese seria necessário um estudo sobre as populações de hemócitos existentes em *Mytilus galloprovincialis* quando sujeitos as condições de trabalho referidas e ver, através de citometria de fluxo, se são os eosinófilos a população com maior percentagem e mais apta para produzir ROS como descrito em *Mytilus edulis*.

A capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão foi determinada em animais infectados e não infectados e observaram-se resultados distintos. Fenantreno não causou qualquer alteração significativa em relação ao controlo em animais infectados, mas em não infectados a percentagem de células fagocíticas diminui. Concentrações intermédias de B[a]P aumentam a percentagem desta células em organismos infectados e não infectados, enquanto que os PCBs diminuem este mecanismo em não infectados mas na presença de concentrações intermédias verificou-se um forte aumento nas células com capacidade fagocítica. Este processo de defesa é considerado como o principal do sistema imunitário de invertebrados, no entanto Torreilles *et al.*, (1996) mostraram num estudo de produção de ROS que estes dois mecanismos estão interligados já que o consumo de oxigénio durante a libertação destes metabolitos é proporcional a capacidade fagocítica. Tendo em conta este resultado podemos dizer que em mexilhões infectados com *Vibrio alginolyticus* e expostos a PAH e PCBs isto não se verifica já que a percentagem de células fagocíticas aumentou onde a produção de ROS obteve aumentos significativos. Isto sugere que concentrações intermédias de B[a]P, Fenantreno e PCBs são o pico máximo de saturação para os hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* frente a uma infecção experimental com *Vibrio*.

A produção de radicais de NO é outro mecanismo do sistema imunitário de bivalves mas é um tema ainda pouco abordado. No capítulo anterior concluiu-se que este mecanismo pode ser compensatório da produção de ROS, no entanto neste não se verifica o mesmo. Fenantreno não causou nenhum efeito nesta produção em animais infectados, já B[a]P aumentou e PCBs inibiram este mecanismo na presença de concentrações intermédias e em infectados.

Observando-se os resultados obtidos no estudo dos parâmetros funcionais, verificou-se que os exemplares de *Mytilus galloprovincialis* não apresentam a mesma resposta imunitária quando infectados por uma bactéria e não infectados. Aquando da exposição dos exemplares de mexilhão a contaminantes o seu sistema imunitário já se encontrava debilitado, como observado no capítulo I. Assim, ao inocular a estes animais uma bactéria, que é um organismo vivo, os mecanismos do sistema imunitário ainda vão ficar mais afectados.

A taxa de mortalidade de mexilhões em estados larvares foi determinada quando sujeitos uma semana a contaminantes e dez dias a uma infecção provocada por *Vibrio alginolyticus*. Como já foi referido anteriormente, esta bactéria está associada a mortalidades em cultivos de larvas de mexilhões mas os nossos resultados mostram que juvenis de *Mytilus galloprovincialis* têm uma elevada capacidade para resistir a infecções e aos contaminantes.

Este capítulo mostra que nem sempre os mecanismos do sistema imunitário dos mexilhões se encontram associados mas que a susceptibilidade a doenças infecciosas é maior nestas condições. Como visto no capítulo I, a produção de azoto poderia funcionar como um mecanismo compensatório da produção de ROS e da fagocitose em *Mytilus galloprovincialis* na presença de contaminantes, mas quando estes se encontram frente a uma infecção experimental e sujeitos a uma dada concentração já não conseguem desenvolver qualquer mecanismo pois os hemócitos podem-se encontrar saturados. Apesar dos resultados obtidos na produção de ROS, de NO e fagocitose podemos dizer que estes mexilhões já ganharam imunidade, porque se não fosse assim como conseguiriam juvenis de mexilhões resistir aproximadamente duas semanas sem alimentação, expostos a uma infecção bacteriana e a contaminantes? Seria interessante desenvolver trabalhos como este, onde se varia os tempos de exposição, os contaminantes e até incorporar novas variáveis como a temperatura e a salinidade.

Conclusões Finais

1. A produção de ROIs no stress oxidativo e a capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão tendem a diminuir e até mesmo inibir à medida que as concentrações de PAH e PCBs aumentam
2. A produção de NO funciona como um mecanismo compensatório em animais expostos a PAH.
3. PAH e PCBs modulam negativamente as respostas do sistema imunitário de *M. galloprovincialis*
4. A resposta dos mecanismos do sistema imunitário do *M. galloprovincialis* expostos a PAH e PCBs encontra-se dependente das propriedades químicas, da concentração e do tempo de exposição
5. Animais expostos a contaminantes apresentam maior susceptibilidade a doenças infecciosas.
6. Organismos infectados com *V. alginolyticus* a partir de concentrações intermédias de PAH e PCBs não conseguem criar uma resposta imunitária
7. Exemplares de *M. galloprovincialis* são dotados de um sistema imunitário bastante eficaz
8. Nem sempre os mecanismos do sistema imune dos mexilhões se encontram associados.
9. Mexilhões infectados experimentalmente e sujeitos a uma dada concentração de PAH e PCBs não tem capacidade de desenvolver qualquer resposta imune, uma vez que os hemócitos dos organismos se encontram saturados

Referências Bibliográficas

- Abbas AK. & Lichtman AH. (2000). General properties of immune responses. In: “*Cellular and molecular immunology*”. Interamericana McGraw Hill.
- Adema, C.; Van der Knapp, W.; Sminia, T. (1991). Molluscan haemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic of Science*, **4**: 210-223
- Allen RC. & Loose LD. (1976). Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 245-252.
- Anderson RS. (1981). Effects of carcinogenic and non-carcinogenic environmental pollutants on immunological functions in marine invertebrates. In *Phylogenetic Approach to Cancer* (C. J. Dawe, J. C. Harshbarger, S. Kondo, T. Sagimura & S. Takayama, eds) pp. 319-331. Tokyo: Japan Sci. Sco. Press.
- Anderson RS. (1994). Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 89-96.
- Anderson RS., Giam CS., Ray LE., Tripp MR. (1981). Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquat. Toxicol.* **1**: 187-195
- Arumugam M., Romestand B., Torreilles J., Roch P. (2000). *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**: 513-519
- Asokan R., Arumugam M., Mullainadhan P. (1997). Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev. Comp. Immunol.* **21**: 1-12.
- Austin KA. & Paynter KT. (1995). Characterization of the chemiluminiscence measured in hemocytes of the Eaastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Zool.* **273**: 461-471.
- Bachère E., Mialhe E., Noel D., Boulo V., Morvan A., Rodriguez J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* **132**: 17-32
- Barreira L. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons and oxidative stress markers in the clam *Ruditapes decussates* from the Ria Formosa (Portugal).

Tese de Doutoramento no ramo de Ciências e Tecnologias do Ambiente da Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente, Universidade do Algarve

- Barreira L., Mudge M., Bebianno M. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in clams *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Journal Environmental Monitoring* **9**:
- Bihari N., Fafandel M., Piskur V. (2007). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 379-387
- Blalock JE. (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today.* **15**: 504-511.
- Buggé DM., Hégaret H., Wikfors GH., Allam B. (2007). Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **23**: 188-196.
- Cajaraville MP. & Pal SG. (1995). Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct. Funct.* **20**: 355-67.
- Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* **57**: 469-476
- Cajaraville M., Olabarrieta I., Marigomez I. (1996). In Vitro activities in mussel haemocytes as biomarkers of environmental quality: a case of study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**: 253-260
- Carballal MJ., López C., Azevedo C., Villalba A. (1997). *In vitro* study of the phagocytic of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 403-416.
- Cardellichio N., Buccoreli A., Giandomenico S., Lopez L., Pizzulli F., Spada L. (2007). Organic pollutants (PAHs, PCBs) in sediments from the Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy)
- Cartier S., Pellerin J., Founier M., Tamigneaux E., Girault L., Lemaire N. (2004). Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture* **241**: 633-652

- Cheng TC. Bivalves. (1981). En: "Invertebrate blood cells". Academic Press, London.
- Cheng TC. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Amer. Zool.* **23**: 129-144.
- Cheng TC. (1984). A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. En: "Comparative Pathobiology. Invertebrate blood cells and serum factors".
- Cheng TC. & Rifkin E. (1970). En "A symposium on diseases of fishes and in the eastern oyster, shellfishes" Spc. Publ. 5 Am. Fish Soc
- Chu F. & Hale E. (1994). Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, *Mar. Environm. Res.* **38**: 243-256
- Coles JA. & Pipe RK. (1994a). Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 337-352.
- Coles, JA.; Farley, SR.; Pipe, RK. (1994b). Effects of fluorathene on the immunocompetence of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* **30**: 367-379
- Coles JA., Farley SR., Pipe RK. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Org.* **22**: 59-65
- Craig EA. (1985). The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**: 239-280.
- Dyrinda EA., Pipe RK., Burt GR., Ratcliffe NA. (1998). Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquat. Toxicol.* **42**: 169-185
- Encomio V. & Chu E. (2000). The effect of PCB on glycogen in the eastern *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, **50**: 45-49
- Fawcett LB. & Tripp MR. (1994). Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to bacteria *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* **63**, 275-284
- Ferreira AM. & Vale C. (1998). PCB accumulation and alteration of lipids in two length classes of the oyster *Crassostrea angulata* and the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environm. Res.* **45**: 259-268

- Feng SY. (1988). Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am. Fish. Soc. Spec. Publ. **18**: 153-168.
- Fisher WS. (1986). Structure and functions of oyster hemocytes. En “Immunity in invertebrates. Cells, molecules and defense reactions”. New York .
- Figueras A. & Cáceres J. (2007). Cultivo del mejillón en Galicia. In: “Biología y cultivo del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en Galicia. Biblioteca de Ciencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H., Brousseau P. (2000). Phagocytic activity as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. Am. Zool. **40**: 412-420
- Freedman S. (1991). The role of α_2 -macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. Comp. Biochem. Physiol. **98B**: 549-553.
- Fries CR. & Tripp MR. (1980). Depression of phagocytosis in *Mercenaria* following chemical stress. Dev. Comp. Immunol. **4**: 233-244
- Fujita T., Matsushita M., Endo Y. (2004). The lectin-complement pathway- its role in innate immunity and evolution. Immunol. Rev. **198**: 185-202.
- Fuoco R., Giannarelli Y., Abete C., Francesconi S., Termine M. (2005). Polychlorobiphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in the sea-surface micro-layer and the water column at Gerlache Inlet, Antarctica. J. Environm. Monit. **7**: 1313-1319
- Gagnaire B., Foruin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish Immunol. **20**: 536-547
- Garcia-Martinez P. & Livingstone D. (1995) Benzo(a)pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of common mussel *Mytilus edulis*, L. Mar. Environ. Res. **39**: 185-189
- Gómez-León J., Villamil L., Lemos ML., Novoa B., Figueras A. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquaculture carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 98-104
- Gómez-Mendikute A., Exteberria A., Olabarrieta I., Cajaraville M. (2002). Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo[a]pyrene. Mar. Environ. Res. **54**: 431-436

- Gómez-Mendikute A. & Caraville MP. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. In Vitro* **17**: 539-546
- González-Laxe F. (2004). Analysis of the economic and social consequences of maritime disasters: the case of Prestige (in Spanish). <http://www.udc.es/iuem/documentos/monografias/analisisPrestige.pdf>
- Gorman MJ., Andreeva OV., Paskewitz SM. (2000). Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene*. 251, 9–17.
- Gourdon I., Guérin MC., Torreilles J., Roch P. (2001). Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*. **5**: 1-6.
- Green LC., Wagner DA., Glogowski J., Skipper PL., Wishnok JS., Tannenbaum SR. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-8
- Grundy M., Moore M., Howell S., Ratcliffe N. (1996). Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* **34**: 273-290
- Hellio C., Bado-Nilles A., Gagnaire B., Renault T., Thomas-Guyon H. (2007). Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 433-440.
- Hernández-López J., Gollas-Galván T., Vargas-Albores F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis*, Holmes. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **113**: 61-66.
- Hiemstra PS. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 116–120.
- Huang HW. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochem.* **39**: 8347-8352.
- Kim T. & Kim YJ. (2002). Overview of innate immunity in *Drosophila*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**: 121-127.
- Laskowski M. Jr., Kato I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 593-626.

- Larson KG., Roberson BS., Hetrick FM. (1989). Effect of environmental pollution on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* **6**: 131-136
- Lemiere S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M-J., Lanhers M-C. Burnel D. *et al* (2005). DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the “Erika” oil-spill. *Mutat. Res.* **581**: 11-21
- Lindquist S. & Craig EA. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- Livingstone D., Garcia R., Martinez P., Michel X., Narbonne J., O’ hara S., Ribera D., Winston G. (1990). Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol.* **4**: 415-424
- Livingstone DR. & Pipe RK. (1992). Mussels and environmental contaminants: molecular and celular aspects. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 25; The mussel Mytilus: Ecology, Physiolgy, Genetics and Cultura* (E. Gosling, ed.) pp. 425-456. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- López C., Carballal MJ., Azevedo C., Villalba A. (1997). Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* **69**: 51-57.
- Lowe D., Fossato V., Depledge M. (1995). Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *M. galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an *in vitro* study. *Marine Ecology Progress Series* **129**: 189-196
- McHenry JG. & Bierkbeck TH. (1986), Inhibition of filtration in *Mytilus edulis* L. by marine vibrios. *J. Fish Dis.* **9**: 257-261
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway CA. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**: 394-397.
- Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* **486**: 185-190.
- Mount AS., Wheeler AP., Paradkar RP., Snider D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science.* **304**: 297-300.
- Neff JM. & Anderson C. (1981). Response of marine animals to petroleum and specific petroleum hydrocarbons. Applied Science Publishers, London.

- Nisticò G. (1993). Communications among central nervous system, neuroendocrine and immune systems: interleukin-2. *Prog. Neurobiol.* **40**: 463-75.
- Noël D., Bachère E., Mialhe E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 483-493
- Nott J. & Moore M. (1987). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmic reticulum. *Histochem. J.* **19**: 357-368
- Nottage AS. & Birkbeck TH. (1990). Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *J. Inverteb. Pathol.* **56**: 15-19
- Novas A., Cao A., Barcia R., Ramos-Martínez JI. (2004). Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 390-394
- Novas A., Barcia R., Ramoz-Martínez J. (2007). After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* **85**: 285-290
- Ordás MC., Novoa B., Faisal M., McLaughlin S., Figueras A. (2001). Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular products. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **130**: 199-206.
- Ordás MC., Novoa B., Figueras A. (2000). Modulation of the chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **10**: 611-22.
- Órdás MC., Albaiges J., Bayona JM., Ordás A., Figueras A. (2007). Assessment of in vivo effects of the Prestige fuel oil spill on the mediterranean mussel immune system. *Arc. Env. Contam, Toxicol.* **52**: 200-206
- Ottaviani E., Paemen LR., Cadet P., Stefano GB. (1993). Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol- Environ. Toxicol. Pharmacol. Sec.* **248**: 319-324.

- Ottaviani E. & Franceschi C. (1997). The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol. Today* **18**: 169-174
- Parry EH. & Pipe RK. (2004). Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* **69**: 311-325
- Pallavicini A, Costa MM, Gestal C, Dreos R, Figueras A, Venier P, Novoa B. (2008). High sequence variability of mytilin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Dev. Comp. Immunol.* **32** 213-226.
- Pipe RK. (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* **22**: 595-603.
- Pipe RK. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 111-22.
- Pipe RK. & Moore MN. (1986). An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysosomal membranes and distribution of the lysosomal enzyme β -glucuronidase in digestive cells of the periwinkle *Littorina littorea*. *Aquat. Toxicol.* **8**: 65-76
- Pipe, RK. & Coles, J. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immun.* **5**: 581-595
- Pipe RK., Coles J., Thomas M., Fossato V., Pulsford A. (1995). Evidence for environmental derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* **46**: 43-54
- Pipe RK., Farley SR., Coles JA. (1997). The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* **289**: 537-545.
- Pruzzo C., Gallo G., Canesi L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with hemolymph components. *Environm. Microb.* **7**: 761-772
- Ratcliffe NA., Rowley AF., Fitzgerald SW., Rhodes CP. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* **97**, 183-350.
- Ratcliffe NA., Brookman JL., Rowley AF. (1991). Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Dev. Comp. Immunol.* **15**: 33-29.

- Rivero. A. (2006). Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Immunoparasitology series* **22**: 219-225
- Roch P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* **172**: 125-145
- Ruddell CL. (1971). The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* **18**: 296-275.
- Safe SH. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**: 87-149
- Sami S., Faisal M., Hugget R. (1992). Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. *Mar. Biol.* **133**: 247-252
- Segre M., Arena S., Greeley E., Melancon M., Graham D., French Jr, J. (2002). Immunological and physiological effects of chronic exposure of *Peromyscus leucopus* to Aroclor 1254 at concentration similar to that found at contaminated sites. *Toxicol.* **174**: 163-172
- Sinderman CJ. (1993). Interactions of pollutants and disease in marine fish and shellfish. In *Advances in Fisheries Science: Pathobiology of marine and estuarine organisms* (J. A. Couch & J. W. Fournie, eds) pp. 451-482. CRC Press: Boca Raton
- Smith KL., Galloway TS., Depledge. (2000). Neuro-endocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates. *The Science of the Total Environment* **262**: 185-190
- Söderhall K. & Hall L. (1984). Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta.* **797**: 99-104.
- Söderhall K. & Smith VJ. (1986). The prophenoloxidase activating system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. En “Immunity in invertebrates”. Springer Verlag
- Song L., Xu W., Li C., Li H., Wu L., Xiang J., Guo X. (2006). Development of expressed sequence tags from the bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biotechnol.* **8**: 161-169.

- Simcik MF.; Eisenreich SJ.; Liroy PJ. (1999). Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan. *Atm. Environm*, **33**: 5071-5079
- Tafalla C., Novoa B., Figueras A. (2002). Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **132**: 423-431.
- Tafalla C., Gómez-León J., Novoa B., Figueras A. (2003). Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 197-205.
- Tanguy A., Guo X., Ford SE. (2004). Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene.* **338**: 121-131.
- Tiscar P. & Mosca F. (2004). Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications*, **28**: 57-62
- Torreilles J., Guerin MC., Roch P. (1996). Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *C.R. Acad. Sci. Paris.* **319**: 209-218.
- Torreilles J. & Romestand B. (2001). *In vitro* production of peroxynitrite by haemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. *BMC Immunol.* **2**: 1.
- Tripp MR. (1992). Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 222-227
- Villamil L., Gómez-León J., Gómez-Chiarri M. (2007). Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* **31**: 968-977.
- Vázquez VJM. (1975). Estudio del conchero prehistórico de las Islas Cíes. *Act. I Jornadas de Metod. Apl. de las Cienc. Hist. I Prehistoria e historia antigua.* Santiago de Compostela. **5**.
- Voie O., Wiik P. & Fonnum F. (1998). *Ortho*-substituted polychlorinated biphenyls activate respiratory burst measured as luminal-amplified chemoluminescence in human granulocytes. *Toxicol. And Applied Pharmacol.* **150**: 369-375

- Winston W., Moore M., Kirchin M., Soverchia C. (1996) Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**: 2221-2229
- Wootton E., Dyrynda E., Ratcliffe, N. (2003a). Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunol.* **15**: 195-210
- Wootton E., Dyrynda E., Pipe R., Ratcliffe N. (2003b). Comparisons of PAH-immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* **65**: 13-25

Anexos

Anexo I – Medição da produção de radicais de oxigénio (ROS)

1. Fazer um corte na concha do mexilhão perto do músculo aductor posterior.
2. Introduzir uma seringa com uma agulha estéril no corte e localizar o músculo aductor (parte mais dura).
3. Extrair a hemolinfa (notar que o embolo da seringa exerce uma pressão e que quando se solta baixa sozinho).
4. Libertar o conteúdo da seringa sem passar pela agulha.
5. Repetir o procedimento anterior até se obter um volume de 1ml por grupo. Este tubo vai ter o nome de pool 1.
6. Utilizar outro grupo de mexilhões para conseguir outro ml de hemolinfa diferente, a que se vai dar o nome de pool 2.
7. Pipetar a hemolinfa em placas de 96 poços adicionando 100 µl a cada um dos poços. Utilizar só uma fila por grupo
8. Deixar repousar a hemolinfa durante 30 minutos a 15°C (placa coberta com papel de alumínio).
9. Enquanto a hemolinfa repousa preparam-se os estímulos que vamos necessitar para induzir o stress oxidativo:
 - a) Pesar 0,018 gr de luminol. Protege-lo da luz.
 - b) Adicionar 1 ml de DMSO (dimetilsulfóxido).
 - c) Preparar um tubo coberto com papel de alumínio onde se adiciona: 2250 µl de água do mar filtrada (FSW), 250 µl de zymosan (substância presente na parede celular de levedura que vai servir como estímulo) e 15 µl da solução de luminol recém preparada. A este tubo dá-se o nome de “Luminol+Zymosan”.
 - d) Preparar outro tubo coberto com papel de alumínio onde se adiciona: 2250 µl de FSW e 15 µl de luminol. A este tubo dá-se o nome de “Luminol” e funciona como controlo negativo da experiência.
10. Adicionar aos poços 1-6 da placa 100 µl da solução “Luminol+Zymosan” e aos poços 7-10 100 µl da solução “Luminol”.
11. Medir num Fluroskan durante 30 minutos.
12. Analisar os resultados, fazendo as médias das réplicas e dos pools.

Anexo II – Medição da produção de radicais de azoto

1. Quantifica-se a concentração de nitrito utilizando a reacção de Griees (Green *et al.*, 1982).
2. Recolhe-se 50 µl de hemolinfa de cada poço da placa do stress oxidativo e transfere-se para outra placa.
3. Adiciona-se a cada poço 100 µl de Reactivo A e B.
4. Deixar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Ler a absorvância a 540 nm.
6. Estima-se a concentração de nitrito presente nos sobrenadantes comparando a absorvância obtida com a de concentrações conhecidas de NaNO₂ (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM). Para comprovar que o padrão utilizado funciona correctamente adiciona-se a placa 50 µl de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM de NaNO₂ e 100 µl de reactivo A e B.

Reactivo A – 1 % de sulfanamida em 2,5 % de H₃PO₄ (50 ml)

1,465 ml do stock de H₃PO₄ (85,3 %), 48,5 ml de água destilada e 0,5 gr de sulfanamida.

Reactivo B (Fotosensível) – 0,1 % de N-nafthyl-ethylenediamine em 2,5 % de H₃PO₄ (50 ml)

1,465 ml do stock de H₃PO₄ (85,3 %), 48,5 ml de água destilada e 0,05 gr de N-nafthyl-ethylenediamine.

Anexo III – Determinação da capacidade fagocítica dos hemócitos de mexilhão

1. Fazer um corte na concha do mexilhão perto do músculo aductor posterior.
2. Introduzir uma seringa com uma agulha estéril no corte e localizar o músculo aductor (parte mais dura).
3. Extrair a hemolinfa (notar que o embolo da seringa exerce uma pressão e que quando se solta baixa sozinho).
4. Libertar o conteúdo da seringa sem passar pela agulha.
5. Repetir o procedimento anterior até se obter um volume de 1 ml por grupo. Este tubo vai ter o nome de pool 1.
6. Utilizar outro grupo de mexilhões para conseguir outros 1 ml de hemolinfa diferente, a que se vai dar o nome de pool 2.
7. Pipetar 500 μ l de hemolinfa para cada um dos poços correspondentes de uma placa de 24 poços. Deixar 1 hora a 15°C para que os hemócitos se peguem ao fundo do poço.
8. Numa placa de 96 poços adicionar 100 μ l de hemolinfa de cada pool e 10 μ l de Tripan Blue. Colocar uma amostra de cada poço numa câmara de Neubauer e contar as células vivas e mortas.
9. Para cada pool tem que se calcular o volume de fluosferas que se tem que adicionar (10 bolas por cada célula)
 - a) Calcular a quantidade de fluosferas que se adiciona.
 - b) Calcular o volume de fluosferas
10. Adicionar as fluosferas nos poços correspondentes e 500 μ l de água do mar filtrada nos poços sem fluosferas. Não esquecer de introduzir um controlo de fluosferas
11. Deixar a placa durante 2 horas a 15°C envolta em papel de alumínio.
12. Eliminar o sobrenadante de cada poço voltando a placa com cuidado sobre um papel absorvente. Adicionar 250 μ l de PBS 1x por as paredes dos poços e voltar a eliminar o sobrenadante.
13. Adicionar, novamente, 250 μ l de PCB 1x e ressuspender as células com um hisópo (com parafilm). Adicionar 25 μ l de Tripan Blue em cada poço.
14. Pipetar 250 μ l da cada poço (Células, PBS 1x e Tripan Blue) a uma placa de 96 poços. Determinar a percentagem de células fagocitadas através de um citometro de fluxo.