

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE INSTITUTO DE BIOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

FERNANDA SILVA DOS SANTOS

O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO MEXILHÃO *Perna perna*: POSSÍVEIS FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia

> Orientadoras: Dra. Valéria Laneuville Teixeira Dra. Natascha Krepsky



O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO MEXILHÃO *Perna perna:* POSSÍVEIS FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia das Águas – LACQUA do Departamento de Ciências do Ambiente - DCA do Instituto de Biociências – IBIO da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO e no Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin – LEMAR do Institut Universitaire
Européen de la Mer – IUEM (França), no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia – PPBI, Universidade Federal Fluminense – UFF e através do programa de doutorado sanduíche do CNPq, respectivamente. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPERJ e ISblue project.

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Valéria Laneuville Teixeira Co-orientadora: Dra. Natascha Krepsky

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV Gerada com informações fornecidas pelo autor

S237s Santos, Fernanda Silva dos

O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO MEXILHÃO Perna perna : POSSÍVEIS
FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS / Fernanda Silva dos Santos. 2023.
95 f.: il.

Orientador: Valéria Laneuville Teixeira.

Coorientador: Natascha Krepsky.
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2023.

1. Bivalve. 2. Proteína. 3. Microbiologia Marinha. 4.

Biotecnologia marinha. 5. Produção intelectual. I. Teixeira, Valéria Laneuville, orientadora. III. Krepsky, Natascha, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

FERNANDA SILVA DOS SANTOS

O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO MEXILHÃO *Perna perna:* POSSÍVEIS FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Dr. Fernando Ramos Queiroga – Institut Universitaire Européen de la Mer / IUEM - Université de Bretagne Occidentale / UBO

Dr. Igor Christo Miyahira – Departamento de Zoologia – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro / UNIRIO

Profa. Dra. Marinella Silva Laport – Departamento de Microbiologia Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro / UFRJ

Profa. Dra. Mirian Araújo Carlos Crapez – Departamento de Biologia Marinha – Universidade Federal Fluminense / UFF

Profa. Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão – Departamento de Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal Fluminense / UFF

Dra. Raquel de Almeida Ferrando Neves – Departamento de Ecologia e Recursos Marinhos – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro / UNIRIO (Suplente)

Profa. Dra. Helena Carla Castro – Departamento de Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal Fluminense / UFF (Suplente)

A Deus e família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar e abençoar meus caminhos, munindo-me de determinação, resiliência e bom ânimo em cada ciclo.

A minha família, em especial meus pais Carmen Lúcia e Ivanildo, e minha irmã Débora, pelo amor, suporte e incentivo em todos os momentos. Obrigada por rirem e chorarem comigo sempre! Amo muito vocês!

Ao meu namorado Douglas e sua Família, que sempre me apoiam e vibram com cada conquista! Vocês também fazem parte disso!

Ao meu cachorro Obama, meu "cãopanheirinho" e dose diária de oxitocina.

A todos os amigos e colegas. Obrigada por sempre torcerem por mim!

As minhas queridas orientadoras Profa. Dra. Valéria Laneuville Teixeira e Profa. Dra. Natascha Krepsky. Obrigada pelo suporte, ensinamentos, conselhos e amizade construída ao longo de todo esse tempo. Tive muita sorte de ser orientada por mulheres como vocês, que são exemplo para mim!

A Dra. Raquel Neves, pesquisadora da UNIRIO, por todo suporte desde a concepção deste projeto. Agradeço por tudo que aprendi com você ao longo do tempo em que trabalhamos juntas, te agradeço pelas oportunidades que viabilizou para mim e pela amizade construída. Você fez toda diferença na minha formação e na minha vida!

Ao Dr. Sébastien Artigaud, meu supervisor no exterior durante meu doutorado sanduíche no *Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin* – LEMAR do *Institut Universitaire Européen de la Mer* – IUEM (França), por me receber tão bem e por todo o suporte e instrução.

Aos amigos e colegas que fiz no LEMAR, em especial Vitor Leite Jardim, Rosa Vega, José Corona e Maéva Gesson. Foi muito bom conhecer vocês!

Ao Prof. Dr. Wanderson Carvalho, docente da UNIRIO, pela parceria na realização das análises no citômetro de fluxo. Muito obrigada!

Aos pesquisadores que em algum momento colaboraram com minha pesquisa, em especial MSc. Amanda Coração, Dr. Benoît Bernay, Dr. Erick Lopes-Filho, Dr. Fernando Queiroga, Prof. Dr. Joel Campos De-Paula, Prof. Dr. Leandro Rocha, Prof. Dr. Luciano N. Santos, Profa. Dra. Patrícia Mirella, Profa. Dra. Sorele Fiaux e Vinícius Barbosa Martins.

A Clarissa Naveira e Nathália Rodrigues, alunas do PPGBIO/UNIRIO, pela parceira em diversos trabalhos e pela amizade que transcende o âmbito profissional. Formamos uma ótima equipe!

Aos amigos de laboratório Beatriz Navarro, Clara Penczek, Elaine Marinho, Helga Assumpção, Júlia Morais, Lara Krespaine, Luísa Mello, Maria Júlia Cavalcante, Rodrigo Batista, Viviane Lino e Yngrid Figueiredo. Obrigada pela colaboração, parceria e amizade!

Às alunas de Iniciação Científica que co-orientei Beatriz Navarro, Clara Penczek, Luísa Mello e Yngrid Figueiredo. Vocês foram excelentes e me deram a oportunidade evoluir como docente e orientadora.

A todo o corpo docente e aos servidores do Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI).

A todos os colegas do PPBI, em especial a Hosana Moitinho, Jenifer Frouche, Jorge Andres Duarte e Yasmin Fingola, pela amizade, colaboração e muitas risadas.

A Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), pelo apoio financeiro, e seus servidores, pela colaboração e parceria que estão sendo fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin – LEMAR do Institut Universitaire Européen de la Mer – IUEM (França) por me abraçarem nessa experiência incrível que foi meu doutorado sanduíche.

Ao apoio financeiro das agências de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e ISblue.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta incrível jornada de aprendizado e crescimento.

SUMÁRIO

LIST	A DE ABREVIATURAS	IX
LIST	A DE FIGURAS	XIII
LIST	A DE TABELAS	XV
LIST	A DE QUADROS	XVI
RESI	OMC	XVII
ABST	TRACT	XVIII
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.	RESULTADOS	25
5.	DISCUSSÃO	
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8.	APÊNDICE 1	90
9.	APÊNDICE 2	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - Proteína contendo domínio transmembrana ABC tipo 1

ACTB_G1 - Actina beta/gama 1

AMPs - Peptídeos antimicrobianos do inglês "Antimicrobial peptides"

ARMC3 – Proteína contendo a repetição Armadillo 3 do inglês "Armadillo repeatcontaining protein 3"

ARMCs - Proteínas contendo a repetição Armadillo do inglês "Armadillo repeatcontaining proteins"

C1qDC - Proteínas contendo o domínio C1q

CF-299 - Proteína 299 associada a cílios e flagelos

CI - Controle injetado

CN - Controle não-injetado

COG - do inglês "Clusters of Orthologous Group"

DCF - Diclorofluoresceína

DCFH-DA - Diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína

DNAH - Dineínas motoras

DNAH3 e DNAH9 - Dineínas axonemais

EAEC - E. coli enteroagregativa do inglês "Enteroaggregative Escherichia coli"

EC - Escherichia coli

EFHC1 – Proteína EFHC1

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico do inglês "*Epidermal growth factor receptor*"

EHEC / STEC - E. coli enterohemorrágica do inglês "Enterohaemorrhagic E. coli"

EIEC - E. coli enteroinvasiva do inglês "Enteroinvasive E. coli"

EPEC - E. coli enteropatogênica do inglês "Enteropathogenic E. coli"

ETEC - E. coli enterotoxigênica do inglês "Enterotoxigenic E. coli"

FERM - Proteína contendo o domínio FERM do inglês "four-point-one, ezrin, radixin, moesin"

FL1 – Detector de fluorescência verde-amarela

FReDs - Proteínas de domínio relacionado ao fibrinogênio do inglês "Fibrinogenrelated domain proteins"

FSC – Diodo "Forward Scatter"; mensura o tamanho relativo celular

GALK2 - Galactoquinase 2 do inglês "Galactokinase 2"

GKs - Guanilato quinases do inglês "Guanylate kinase"

GNBPs - Proteínas de ligação gram-negativas do inglês "Gram-negative binding proteins"

GO - do inglês "Gene Ontology"

GPD2 - Glicerol-3-fosfato desidrogenase do inglês "Glycerol-3-phosphate dehydrogenase"

H2A - Histona H2A

HNF4α ou NR2A1 - Fator nuclear de hepatócito-4α

JNK - Proteína quinase ativada por estresse JNK do inglês "Stress-activated protein kinase JNK"

LC-MS/MS – do inglês "Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry"

LFQ - do inglês "Label Free Quantification"

LRGUK - Proteína contendo o domínio de repetição rico em leucina (LRR) e o domínio guanilato quinase (GK) do inglês "*Leucine-rich repeat and guanylate kinase domain-containing protein*"

MAGUKs – Guanilato quinases associadas a membrana do inglês "Membraneassociated guanylate kinases"

MAPK – Cascata da proteína quinase ativada por mitogênio do inglês "*Mitogenactivated protein kinase*"

MDH2 - Malato desidrogenase do inglês "Malate dehydrogenase"

MPPs - Proteases processadoras mitocondriais do inglês "*Mitochondrial processing proteases*"

MTFP1 - Proteína 1 do processo de fissão mitocondrial do inglês "*Mitochondrial fission process protein 1*"

NaCI - Cloreto de Sódio

NRs - Receptores nucleares do inglês "Nuclear receptors"

NUG1 - Proteína de ligação a GTP nuclear do inglês "Nuclear GTP-binding protein"

OGDHL - Oxoglutarato desidrogenase do inglês "Oxoglutarate dehydrogenase"

PA28y ou PSME3 - Ativador de proteassoma PA28y

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos do inglês "Pathogenassociated molecular patterns"

PAs - Ativadores de proteassoma do inglês "Proteasome activators"

PBS - do inglês "Phosphate-Buffered Saline"

PBS-NaCI - do inglês "Phosphate-Buffered Saline added with NaCl"

PGRPs - Proteínas de reconhecimento de peptidoglicano do inglês "*Peptidoglycan recognition proteins*"

PHM - Porcentagem de hemócitos mortos

PMPCA - Subunidade alfa da peptidase processadora mitocondrial do inglês "*Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha*"

PMPCB - Subunidade beta da peptidase de processamento mitocondrial do inglês *"Mitochondrial-processing peptidase subunit beta"*

PRRs – Receptores de reconhecimento padrão do inglês "Pattern recognition Receptors"

PUF60 - Fator de ligação poli-U de 60 kDa do inglês "Poly-U-binding factor 60 kDa"

PV - Praia Vermelha

RCL1 - RNA 3-fosfato ciclase tipo 1 do inglês "RNA 3-phosphate cyclase-like 1"

RHBDL1_2_3 - Romboide-protease

RNS - Espécies reativas de nitrogênio do inglês "Reactive nitrogen species"

ROS – Espécies reativas de oxigênio do inglês "Reactive oxygen species"

RPL18A - Proteína ribossomal 60S L18a do inglês "60S ribosomal protein L18a"

SE - Salmonella enterica

SF3A1 - Fator de "*splicing*" 3A subunidade 1 do inglês "*Splicing factor 3A subunit* 1"

SODs - Enzimas superóxido dismutase do inglês "Superoxide dismutase"

SRCRs - Proteínas ricas em cisteína do receptor "Scavenger" do inglês "Scavenger receptor cysteine-rich"

SS - Ágar Salmonella-Shigella

SSC - Sensor "Side Scatter"; mensura a complexidade intracelular relativa

TCA - ácido tricarboxílico do inglês "Tricarboxylic acid"

TCBS - Ágar "Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose"

TEPs - Proteínas contendo tioéster do inglês "Thioester-containing proteins"

THC - Contagem total de hemócitos do inglês "Total hemocyte count"

THO - Complexo multisubunidade THO

THOC1 - Proteína THOC1

TLRs - Receptores "toll-like" do inglês "Toll-like receptors"

TREX - Complexo de transcrição e exportação do inglês "*Transcription and export complex*"

- TSB do inglês "Tryptic Soy Broth"
- UA Unidades Arbitrárias
- UFC Unidades Formadoras de Colônias
- VP Vibrio parahaemolitycus
- vWA Proteína contendo o domínio "von Willebrand Factor A"
- β-Tubulina Tubulina de cadeia beta

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localização da Praia Vermelha (PV), Rio de Janeiro, RJ	15
Figura 2. Características anatômicas externas e internas do mexilhão Perna perna	16
Figura 3. Parâmetros hemocitários mensurados a partir da hemolinfa do mexilhão <i>Perna perna</i> de acordo com cada condição testada: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); <i>Escherichia coli</i> (EC); <i>Salmonella enterica</i> (SE); e <i>Vibrio parahaemolitycus</i> (VP). a) Densidade; b) Atividade fagocítica; c) Tamanho celular relativo (FSC); d) Complexidade intracelular relativa (SSC); e) Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n= 5 por tratamento). As diferenças significativas (p < 0.05) observadas em cada parâmetro de acordo com os diferentes tratamentos estão aqui representadas por letras ou *.	27
Figura 4. Abundância de bactérias viáveis remanescentes na hemolinfa do mexilhão <i>Perna perna</i> após 4 h do desafio bacteriano (UFC mL ⁻¹) de acordo com as seguintes condições: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); <i>Escherichia coli</i> (EC); <i>Salmonella enterica</i> (SE). Os símbolos representam colônias rosadas (R), pretas (P) e outras (O). Os dados são expressos como médias ± desvio padrão (n = 5 amostras) dos tratamentos acima.	29
Figura 5. Gráfico " <i>Upset plot</i> " para visualizar os conjuntos-interseção de proteínas significativamente diferentes entre as condições testadas. CN – Controle não injetado; CI - Controle injetado; EC - <i>Escherichia coli</i> ; SE - <i>Salmonella entérica</i> ; e VP - <i>Vibrio parahaemolitycus</i> . SE_EC corresponde à diferença significativa entre essas duas condições e assim por diante.	30
Figura 6. a) Número de proteínas reguladas negativamente (327) e acumuladas (16) no mexilhão <i>Perna perna</i> , dentre as 343 proteínas significativamente diferentes entre <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (VP) e todas as demais condições (CN - controle não injetado; CI - controle injetado; EC - <i>Escherichia coli</i> ; e SE - <i>Salmonella enterica</i>). b) Frequência (%) das categorias funcionais das proteínas alteradas após o desafio com VP, que são significativamente diferentes de todas as outras condições, com base no " <i>Database of Clusters of Orthologous Genes – COGs</i> ". T - Mecanismos de transdução de sinal; O - Modificação pós-traducional, " <i>turnover</i> " de proteínas e chaperonas; S - Função desconhecida; U - Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; A - processamento e modificação de RNA; Z - Citoesqueleto; K - Transcrição. Como as 16 proteínas acumuladas não se encaixaram em nenhuma categoria	

funcional COG, as proteínas significativamente diferentes em resposta específica a VP em todas as categorias funcionais mostradas no gráfico, foram reguladas negativamente.....

Figura 7. Comparação da porcentagem (%) de proteínas encontradas em todos os grupos (proteínas totais identificadas no mexilhão *Perna perna*) e proteínas alteradas em resposta específica a *Vibrio parahaemolyticus* (VP; significativamente diferentes de todos os outros grupos), de acordo com as oito categorias funcionais (COG) mais frequentes......

Figura 8. Papel imune-relacionado das proteínas alteradas em uma célula ciliada do hepatopâncreas do mexilhão *Perna perna*, 24h após a injeção com *Escherichia coli*.

Figura 9. Papel imune-relacionado das proteínas alteradas – acumuladas ou reguladas negativamente - em uma célula ciliada do hepatopâncreas do mexilhão *Perna perna*, 24 h após a injeção com *Salmonella enterica*.

Figura 10. Papel imune-relacionado das proteínas alteradas – acumuladas ou reguladas negativamente - em uma célula ciliada do hepatopâncreas do mexilhão *Perna perna*, 24 h após a injeção com *Vibrio parahaemolyticus*.

63

35

36

46

53

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Parâmetros imune-celulares (média ± desvio padrão) mensurados a partir de hemolinfa de <i>Perna perna</i> de acordo com cada condição testada: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); Escherichia coli (EC); Salmonella enterica (SE); e Vibrio parahaemolitycus (VP)	26
Tabela 2. Abundância de bactérias viáveis na hemolinfa do mexilhão <i>Perna perna</i> após 4 h do desafio bacteriano (média ± desvio padrão) de acordo com a morfologia das colônias (pretas, rosadas e outras – brancas, incolores e marrons), para as seguintes condições: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); <i>Escherichia coli</i> (EC); <i>Salmonella enterica</i> (SE); e <i>Vibrio parahaemolitycus</i> (VP)	28
Tabela 3. Lista de proteínas significativamente diferentes dos controlesnão injetados (CN) e injetados (CI), identificados no hepatopâncreas demexilhões Perna perna após desafio bacteriano - Escherichia coli (EC),Salmonella enterica (SE) e Vibrio parahaemolyticus(VP)	32

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1: Diferentes espécies de bivalves eficientes na biorremediação	
de vírus, bactérias e protozoários	9

RESUMO

Em todo o mundo, as áreas costeiras marinhas são afetadas pela descarga de efluentes, sobretudo próximo às grandes cidades. Cada m³ de efluente doméstico sem tratamento pode transportar milhões de patógenos, incluindo bactérias como Escherichia coli, Salmonella enterica e Vibrio spp. Estas bactérias podem causar danos à saúde humana através da ingestão de alimentos crus ou malcozidos e da recreação em ambientes contaminados. Os moluscos bivalves são organismos sésseis e filtradores, que acumulam as bactérias presentes na coluna d'água, incluindo as introduzidas pela ação antrópica. Entretanto, os bivalves possuem um eficiente sistema imune que os permite combater e eliminar tais bactérias de seu organismo. Pontos críticos da interação entre bactérias e o sistema imune dos bivalves podem render aplicações em diversas áreas, como por exemplo, em biomonitoramento, biorremediação e como fonte de moléculas de interesse humano. O mexilhão Perna perna é um recurso valioso para a aquicultura em regiões costeiras tropicais e subtropicais. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi investigar a resposta imune celular e molecular do mexilhão P. perna frente ao desafio com bactérias introduzidas - Escherichia coli (EC) e Salmonella enterica (SE) – e nativa do ambiente marinho - Vibrio parahaemolyticus (VP) – a fim de explorar possíveis aplicações biotecnológicas resultantes dessa interação. Foram observadas respostas distintas de acordo com as bactérias testadas. De forma geral, os mexilhões desafiados com VP apresentaram resposta, tanto celular quanto proteica, mais acentuada em comparação aos injetados com as outras bactérias – EC e SE. O mexilhão parece lidar e eliminar facilmente as bactérias introduzidas no ambiente marinho – e patogênicas para o homem – de forma oposta ao que acontece com VP que é virulenta para o bivalve. Em relação a resposta celular, os parâmetros densidade, fagocitose e produção de ROS se mostraram determinantes no combate às bactérias. Com respeito a resposta molecular, pela primeira vez, foi possível observar um perfil global de proteínas do hepatopâncreas de P. perna (um total de 3.805), com foco em proteínas críticas para a relação mexilhão-bactéria. Em geral, ou seja, para as três bactérias testadas, proteínas significativamente diferentes - reguladas negativamente ou acumuladas desempenharam papéis críticos na resposta imune do mexilhão. Por se tratar de uma espécie comestível e, consequentemente, de interesse econômico, os dados gerados podem ser úteis na biotecnologia como biomarcadores celulares e moleculares relacionados à exposição de bactérias. Adicionalmente, entre a enorme gama de compostos relacionados a defesa contra bactérias, podem ser encontradas moléculas bioativas de interesse humano. Levando em consideração que o sistema imune do mexilhão P. perna consegue facilmente eliminar as bactérias introduzidas no ambiente marinho – E. coli e S. enterica, seria viável o seu manejo para biorremediação de ecossistemas aquáticos impactados com bactérias patogênicas para o ser humano. Assim, os resultados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias e ferramentas para manutenção da condição de saúde dos bivalves em cultivos, além de seu uso na melhoria da qualidade ambiental.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Hemócitos, Hepatopâncreas, Proteômica, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*.

ABSTRACT

Around the world, marine coastal areas are impacted by effluent discharges, mainly close to big cities. Each m³ of sewage, for example, may bring millions of pathogens, including bacteria such as Escherichia coli, Salmonella enterica, and Vibrio spp. These bacteria can harm human health by eating raw or undercooked foods and by recreation in contaminated environments. Bivalve mollusks are sessile and filter-feeding organisms, that accumulate bacteria from the water column. including those introduced by anthropic activity. However, bivalves' immune system is efficient and allows them to fight and eliminate such bacteria from their body. Critical points on the interaction between bacteria and bivalves' immune system can render solutions in several areas, for example biomonitoring, bioremediation, and as a source of molecules of human interest. The mussel Perna perna is a valuable resource for aquaculture in tropical and subtropical coastal regions. Therefore, this study aimed to investigate cellular and molecular immune responses of the mussel P. perna challenged with introduced - Escherichia coli (EC) and Salmonella enterica (SE) - and native bacteria from the marine environment - Vibrio parahaemolyticus (VP) - to explore possible biotechnological applications resulting from this interaction. Responses were differential according to the tested bacteria. In general, mussels challenged with VP showed increased cellular and protein responses compared to those injected with EC and SE. The mussel seems to efficiently deal with and eliminate bacteria introduced into the marine environment - and pathogenic for humans – as opposed to VP, which is virulent for him. Regarding cellular response, the following hemocyte parameters were critical in the fight against bacteria: density, phagocytosis, and ROS production. Concerning molecular response, for the first time, it was possible to notice a global profile of P. perna hepatopancreas proteins (a total of 3805), focusing on critical proteins for the mussel-bacteria relationship. For the three tested bacteria, significantly different proteins - downregulated or accumulated - played critical roles in the mussel's immune response. Since *P. perna* is an edible and, consequently, economically important species, the data generated here can be helpful in biotechnology as cellular and molecular biomarkers related to bacteria exposure. Additionally, bioactive molecules of human interest can be found among the huge range of compounds related to defense against bacteria. Given that the P. perna immune system can easily eliminate bacteria introduced into the marine environment -E. coli and S. enterica – its management for bioremediation of aquatic ecosystems impacted by pathogenic bacteria for humans would be feasible. In this way, our results can contribute to developing strategies and tools to support the health status of bivalves in marine farms as well as their use for environmental quality improvement.

Keywords: *Escherichia coli*, Hemocytes, Hepatopancreas, Proteomics, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*.

1. INTRODUÇÃO

As áreas costeiras marinhas são afetadas por descargas de efluentes, sobretudo próximo às grandes cidades (ISLAM E TANAKA, 2004; SHUVAL, 2003). Em todo o mundo, ao longo da costa, efluentes são lançados diariamente no mar, direta ou indiretamente, com pouco ou nenhum tratamento, trazendo consigo uma ampla gama de poluentes e nutrientes (ISLAM E TANAKA, 2004), incluindo microrganismos patogênicos (WANG *et al.*, 2014). De acordo com SHUVAL (2003), cada m³ de efluente doméstico sem tratamento pode transportar milhões de patógenos, dentre eles *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Vibrio* spp. Estas bactérias podem causar danos à saúde dos seres humanos através da ingestão de alimentos crus ou malcozidos e da recreação em ambientes contaminados

E. coli e *S. enterica* são bactérias associadas a contaminação fecal e conhecidas pelo seu potencial de patogenicidade causando gastroenterites. A espécie *S. enterica* subespécie *enterica* abriga, ainda, sorotipos causadores de outras doenças, como a *S. enterica* sorotipo *Typhi* que é o agente etiológico da febre tifoide. Essa doença é transmitida pela ingestão de água e alimentos contaminados com fezes e configura um problema de saúde, sobretudo em países em desenvolvimento (MADIGAN *et al.,* 2010). *Vibrio parahaemolyticus* é natural de ecossistemas marinhos, porém também é um importante patógeno causador de gastrenterite humana associada ao consumo de alimentos marinhos (MADIGAN *et al.,* 2010). PEREIRA *et al.* (2007), ao avaliar 86 amostras de mexilhões *Perna perna* comercializados em Niterói, RJ, observou a presença de *V. parahaemolyticus* em 11,6% das amostras *in natura* e pré-cozidos, mostrando a relevância da bactéria em termos de Saúde Pública.

Dentre os recursos marinhos, os moluscos bivalves são os mais impactados pela contaminação antrópica. Por serem sésseis e filtradores, podem acumular bactérias, dentre outros poluentes, presentes na coluna d'água (ABESSA *et al.,* 2005; ANTUNES *et al.,* 2010; CANESI *et al.,* 2002). Essa característica os torna, ainda, possíveis veículos de toxinas, contaminantes e bactérias patogênicas para os níveis tróficos acima, incluindo o ser humano (D'MELLO, 2003; SHUVAL, 2003).

Os mecanismos de defesa imunológica dos bivalves, entretanto, são muito eficientes e os permite sobreviver e distribuir-se amplamente em ambientes com grande carga bacteriana (ABESSA *et al.,* 2005; ANTUNES *et al.,* 2010; CANESI *et*

al., 2002). Esses invertebrados podem filtrar bactérias presentes na água, combater e eliminá-las de seu organismo por meio da ação de suas células de defesa, os hemócitos (ABESSA *et al.,* 2005; ANTUNES *et al.,* 2010; CANESI *et al.,* 2002). Estas células estão presentes na hemolinfa (fluido constituído pelo plasma e hemócitos) dos moluscos e são rapidamente acionadas durante as reações de defesa. Além da resposta celular primária através dos hemócitos, existe ainda o sistema de defesa humoral, que conta com uma vasta gama de moléculas antimicrobianas (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Os processos biológicos dos bivalves, principalmente os relacionados a filtração e imunologia, podem ter aplicação biotecnológica, por exemplo: na biorremediação, no biomonitoramento e como fonte de moléculas de interesse humano. A biorremediação consiste no emprego de processos biológicos de organismos vivos na remoção ou redução de poluentes no ambiente (GAYLARDE *et al.,* 2005). Considerando a capacidade de filtração e depuração dos bivalves, alguns estudos vêm mostrando potencial aplicação desses animais na biorremediação de ambientes impactados com alta carga de bactérias patogênicas e eutrofizados (ANTUNES *et al.,* 2010; BIANCHI *et al.,* 2014; BIANCHI *et al.,* 2015; BIANCHI *et al.,* 2016).

Como mencionado acima, por serem sésseis e filtradores, os bivalves podem acumular várias classes de poluentes, incluindo bactérias (ABESSA *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2010; CANESI *et al.*, 2002). Desta forma, esses moluscos podem fornecer um quadro da biodisponibilidade local de contaminantes através da simples mensuração em seus tecidos ou de biomarcadores (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b). Essas e outras características - como grande abundância, ampla distribuição e tolerância a diversas condições ambientais - os tornam adequados para serem utilizados no biomonitoramento, isto é, na avaliação ambiental a partir de seres vivos locais (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b).

O estudo da interação dos bivalves com bactérias pode, ainda, apontar moléculas de interesse humano, por exemplo, novos compostos antimicrobianos e outras moléculas bioativas para serem aplicadas nos mais diversos campos (NALINI *et al.*, 2018; SOUSA E HINZMANN, 2020). Diante disso, o objetivo da presente pesquisa foi investigar os mecanismos de defesa do mexilhão *Perna perna* frente a exposição a bactérias introduzidas - *E. coli*, *S. enterica* – e a nativas do ambiente marinho - *V. parahaemolyticus* – a fim de explorar possíveis aplicações

biotecnológicas dos processos biológicos do mexilhão, como biorremediação, biomonitoramento e moléculas-chave na interação bivalve-bactéria.

O mexilhão *P. perna* é considerado espécie-chave para a aquicultura, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo amplamente consumido e cultivado, inclusive em locais sujeitos a contaminação fecal, como a Baía de Guanabara, RJ (LAGE E JABLONSKI, 2008). O esclarecimento de fatores relacionados aos mecanismos de defesa dos mexilhões *P. perna* e como se dá sua interação com bactérias pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias e ferramentas a serem aplicadas tanto na manutenção da condição de saúde dos bivalves, principalmente em sistemas de cultivo, como na melhoria da qualidade ambiental.

1.1 BACTÉRIAS DE INTERESSE

A espécie *Escherichia coli* consiste em bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A maioria das cepas de *E. coli* compõe a microbiota natural intestinal humana e de outros animais de sangue quente. A bactéria é liberada junto às fezes e tem sua presença e abundância relacionada ao grau de contaminação fecal de um ambiente, indicando a presença de outros patógenos. Esses e outros fatores, como sua detecção rápida e fácil, tornam *E. coli* o principal indicador microbiológico de contaminação fecal (GOMES *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

A maioria das cepas de *E. coli* raramente causa doenças em indivíduos saudáveis. Entretanto, existe uma série de cepas patogênicas que podem afetar principalmente o trato intestinal, tanto em indivíduos saudáveis quanto em imunocomprometidos. As cepas patogênicas normalmente chegam ao solo, corpos hídricos e alimentos através da contaminação fecal, principalmente em locais onde há falta de saneamento (GOMES *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

As cepas patogênicas de *E. coli* são coletivamente conhecidos como diarreiogênicas, e podem ser classificadas como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (produtora de toxina Shiga) (EHEC / STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (GOMES *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017). Essa

classificação é baseada nos locais de colonização preferencial do hospedeiro, mecanismos de virulência e os sintomas e consequências clínicas decorrentes da infecção pelas cepas diarreiogênicas, que são um dos mais importantes agentes etiológicos da diarreia no mundo (GOMES *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

As EPEC são definidas atualmente como as cepas de *E. coli* capazes de causar diarreia, produzir dano histopatológico no epitélio intestinal conhecido como lesão de fixação e obliteração, além da incapacidade de produzir toxinas Shiga e termolábeis ou enterotoxinas estáveis ao calor. As EPEC são importantes patógenos diarreicos, afetando principalmente crianças, apresentando como sintomas mais comuns diarreia aquosa, dor abdominal, náuseas, vômitos e febre (GOMES *et al.*, 2016; JANG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

A espécie Salmonella enterica abrange bacilos Gram-negativos intracelulares facultativos da família Enterobacteriaceae. A espécie é composta por seis subespécies, a saber: enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica. A subespécie enterica possui aproximadamente 1.547 sorotipos e, dentre estes, 99% podem causar infecções entéricas em animais, incluindo humanos (BALASUBRAMANIAN et al., 2019; BARRETO et al., 2016; FERRARI et al., 2019).

Os sorotipos de Salmonella podem ser classificadas em tifoide e não tifoide. Os primeiros pertencem a uma subcategoria altamente adaptada aos hospedeiros humanos, são eles: *Typhi, Sendai* e *Paratyphi* A, B e C. Os sorotipos *Typhi* e *Sendai* são responsáveis pela febre tifoide, que apresenta como sintomas febre alta, diarreia, vômitos, dores de cabeça e, em casos extremos, morte. Os sorotipos *Paratyphi* A, B e C causam a febre entérica, que se manifesta de forma mais leve, com sintomas como diarreia, cólicas, febre e vômitos, podendo levar à septicemia (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2019; BARRETO *et al.*, 2016; FERRARI *et al.*, 2019).

Os sorotipos não tifoides, por sua vez, colonizam o trato intestinal de uma ampla gama animais domésticos e selvagens. Esses sorotipos causam a salmonelose entérica, que geralmente é autolimitante e caracterizada por febre, dor abdominal, vômito e diarreia. A transmissão de *Salmonella* spp. está igualmente relacionada à contaminação fecal, através de uma variedade de matrizes como água e alimentos contaminados (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2019; BARRETO *et al.*, 2016; FERRARI *et al.*, 2019).

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria halofílica Gram-negativa da família Vibrionaceae. Ao contrário de *E. coli* e *S. enterica*, que são bactérias entéricas que alcançam os corpos hídricos através de fontes antrópicas, *V. parahaemolyticus* é nativa de ecossistemas costeiros e estuarinos, além de estar associada a uma ampla variedade de organismos marinhos, como peixes, moluscos e crustáceos. *V. parahaemolyticus* é uma das três cepas patogênicas para os humanos mais importantes do gênero *Vibrio*, juntamente com *V. cholerae* e *V. vulnificus* (BONNIN-JUSSERAND *et al.*, 2017; GHENEM *et al.*, 2017).

A maior parte dos casos de vibriose causada por *V. parahaemolyticus* se dá pela contaminação por água do mar e frutos do mar crus ou mal cozidos. A doença é caracterizada por uma gastroenterite aguda, onde os sintomas incluem diarreia, náuseas, dor abdominal, vômitos e febre baixa. Na maioria dos casos, a doença é autolimitante e os sintomas estão associados à produção de proteínas termostáveis de hemolisina direta ou hemolisina relacionada a proteínas termostáveis de hemolisina direta (BONNIN-JUSSERAND *et al.*, 2017; GHENEM *et al.*, 2017).

1.2 O SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS BIVALVES

Os bivalves possuem sistema imunológico exclusivamente inato ou natural, ou seja, que apresenta resposta rápida e inespecífica frente aos patógenos. De forma oposta, a resposta imune adaptativa apresentada por vertebrados é mais lenta, por conta da especificidade e produção de anticorpos (NETEA *et al.*, 2016). A resposta imune dos bivalves é composta por mecanismos de defesa celulares e humorais - a partir de produtos celulares (GOSLING, 2015; LADHAR-CHAABOUNI E HAMZA-CHAFFAI, 2016). Os principais imunoefetores celulares são os hemócitos, células circulantes que compõem a hemolinfa, plasma incolor, e infiltram tecidos circunjacentes para reparo e defesa (CANESI *et al.*, 2002; GOSLING, 2015; LADHAR-CHAABOUNI E HAMZA-CHAFFAI, 2016).

Após as barreiras externas como concha e manto, os hemócitos constituem a primeira linha de defesa contra parasitas e patógenos e possuem as seguintes capacidades: produção de metabólitos tóxicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS); liberação de enzimas lisossômicas a partir dos seus grânulos (principalmente o subtipo celular granular) e atividade fagocítica e de

encapsulação (DONAGHY *et al.,* 2015; GOEDKEN E DE GUISE, 2004; GOSLING, 2015; LADHAR-CHAABOUNI E HAMZA-CHAFFAI, 2016; SAUVÉ *et al.*, 2002).

Ao se depararem com agentes infecciosos, as primeiras reações de defesa dos hemócitos são hemocitose, fagocitose e encapsulamento (CANESI *et al.,* 2002; GOSLING, 2015; LADHAR-CHAABOUNI E HAMZA-CHAFFAI, 2016; SAUVÉ *et al.,* 2002). A hemocitose se trata de um aumento mensurável no número de hemócitos circulantes (CANESI *et al.,* 2002; GOSLING, 2015). Isto é, após o reconhecimento de um corpo estranho, ocorre a sinalização e consequente movimentação dos hemócitos para o local em questão. Com isso, observa-se um aumento no número de hemócitos em circulação na hemolinfa (CANESI *et al.,* 2002; GOSLING, 2015).

A fagocitose envolve as etapas de quimiotaxia (deslocamento celular através de um gradiente de concentração químico), reconhecimento e adesão através de receptores de superfície celular (como as proteínas integrinas e lectinas), englobamento por endocitose e degradação do antígeno no interior do fagolisossomo (CANESI *et al.,* 2002; GOSLING, 2015; LADHAR-CHAABOUNI E HAMZA-CHAFFAI, 2016; SAUVÉ *et al.,* 2002). O encapsulamento, por sua vez, está relacionado a parasitas de maior tamanho, que neste caso, não poderiam ser fagocitados. Nesta resposta os hemócitos, principalmente granulócitos, se dispõem ao redor do parasita, impedindo sua proliferação e liberando enzimas degradativas e radicais livres para sua destruição (GOSLING, 2015; SAUVÉ *et al.,* 2002).

Outro importante mecanismo de ação degradativa é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos hemócitos. Diversos estressores como patógenos e poluentes, além da própria atividade fagocítica, são gatilhos para sua produção, incluindo ânions superóxido (O₂--), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH--). As ROS atuam principalmente na oxidação de proteínas, carboidratos ou ácidos nucleicos, e desempenham importante papel na ação antimicrobiana via fagocitose (DONAGHY *et al.,* 2015; GOSLING, 2015).

Embora não haja consenso quanto aos subtipos celulares dos hemócitos, são reconhecidas duas subpopulações principais: granulócitos e agranulócitos (ou hialinócitos). Os granulócitos detêm muitos grânulos citoplasmáticos, enquanto os hialinócitos possuem poucos ou nenhum (DONAGHY *et al.*, 2009; GOSLING, 2015; LADHAR-CHAABOUNI E HAMZA-CHAFFAI, 2016;). De acordo com BARRACCO *et al.* (1999) o mexilhão *Perna perna* possui os dois subtipos celulares, sendo os hialinócitos mais abundantes, compondo aproximadamente 60% dos hemócitos.

Além da proporção, granulócitos e hialinócitos podem diferir também em suas funções, como atividade fagocítica ou produção de ROS (GOEDKEN E DE GUISE, 2004; DONAGHY *et al.*, 2009). Em *P. perna*, ambos os tipos de hemócitos, mas principalmente granulócitos, são ativamente fagocitários e contêm fosfatase ácida, que sugere a presença de lisossomos e função de degradação intracelular (BARRACCO *et al.*, 1999).

Além da resposta celular primária, existe o sistema de defesa humoral, onde os hemócitos secretam diversos fatores hemolinfáticos como lectinas, peptídeos antimicrobianos (AMPs) e enzimas lisossômicas (CANESI et al., 2002; GOSLING, 2015). Fatores humorais na hemolinfa e nos tecidos atuam sincronizados com os hemócitos durante as reações de defesa (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). O primeiro passo para iniciar uma reação imune contra patógenos é a detecção e reconhecimento (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). Assim, moléculas evolutivamente conservadas - receptores de reconhecimento padrão (PRRs) - identificam marcadores específicos nos patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). Os principais PRRs são receptores "toll-like" (TLRs), lectinas (por exemplo, proteínas de domínio relacionado ao fibrinogênio - FReDs e contendo o domínio C1g - C1gDC), proteínas contendo tioéster (TEPs), proteínas ricas em cisteína do receptor "Scavenger" (SRCRs), proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs) e proteínas de ligação gram-negativas (GNBPs) (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Após a detecção e reconhecimento, a sinalização induz os hemócitos a se deslocarem para o local da reação e/ou ativarem outros componentes humorais (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). Os principais efetores humorais diretamente envolvidos na morte de patógenos são os peptídeos antimicrobianos (AMP). Essas moléculas são categorizadas em defensinas, grandes defensinas, mitilinas, miticinas e mitimacinas (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). Outras moléculas que participam da defesa humoral são as proteínas bactericidas/aumentadoras de permeabilidade (BPIs), proteases e lisozimas, proteínas de choque térmico (HSPs) e inibidores de proteases (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020).

7

1.3 POSSÍVEIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS BIVALVES

Os bivalves desempenham diversos serviços ecossistêmicos, dentre eles a redução da carga de microrganismos e nutrientes da água, através de seu processo de filtração (BRICKER *et al.*, 2018; OLIVIER *et al.*, 2018). Como já mencionado, na biorremediação ocorre a aplicação de processos biológicos de organismos vivos para a remoção ou redução de poluentes no ambiente (GAYLARDE *et al.*, 2005). De acordo com GOSLING (2015), a taxa de filtração dos bivalves é definida como o volume de água que flui através das brânquias por unidade de tempo. Já a taxa de depuração, que de fato resulta na biorremediação, corresponde ao volume de água que tem suas partículas retidas pelos bivalves por unidade de tempo (GOSLING, 2015). Uma vez retidos pelas brânquias, grande parte os microrganismos filtrados da água são digeridos e/ou combatidos através do sistema imune do bivalve (BIANCHI *et al.*, 2014; GOSLING, 2015; LARA *et al.*, 2002).

Tendo em vista a grande capacidade de depuração desses moluscos, diversos autores têm sugerido seu uso como biofiltros para a bioremediação de efluentes ou ecossistemas aquáticos eutrofizados (BIANCHI *et al.*, 2014; GÉBA *et al.*, 2020a; GÉBA *et al.*, 2020b; ISMAIL *et al.*, 2015; ISMAIL *et al.*, 2016; LARA *et al.*, 2002; MEZZANOTTE *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2020). Apesar das condições desfavoráveis, os bivalves mostram resiliência e capacidade de se adaptar a ambientes intensamente poluídos (GÉBA *et al.*, 2020a; SABATINI *et al.*, 2011). GÉBA *et al.* (2020a), por exemplo, mostrou que o mexilhão zebra (*Dreissena polymorpha*) transplantado para um canal de saída de águas residuais se manteve em boas condições fisiológicas e foi capaz de acumular protozoários patogênicos.

A característica de resistência supracitada aliada à capacidade de filtrar microrganismos em altas concentrações, torna os bivalves uma ferramenta promissora para a biorremediação da poluição urbana, inclusive de microrganismos patogênicos para o homem (BIANCHI *et al.*, 2014; GÉBA *et al.*, 2020a; GÉBA *et al.*, 2020b; ISMAIL *et al.*, 2015; ISMAIL *et al.*, 2016; LARA *et al.*, 2002; MEZZANOTTE *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2020). O quadro 1 mostra diferentes espécies de bivalves que foram eficientes não só na depuração de bactérias da água, mas também de vírus e protozoários patogênicos. Há trabalhos, ainda,

mostrando que alguns bivalves foram eficientes na biorremediação de efluentes contaminados por metais (ROSA *et al.*, 2014) e de poluentes emergentes como microplásticos, nanopartículas e drogas (BROSZEIT *et al.*, 2015).

Além do processo de depuração, o bivalve também auxilia na interação interespécies da comunidade microbiana e ciclagem de nutrientes no sistema, o que contribui ainda mais para a restauração do ecossistema aquático impactado (LUKWAMBE *et al.*, 2020). Há ainda a possibilidade de potencializar a biorremediação, utilizando outras espécies associadas ao bivalve, como esponjas (LONGO *et al.*, 2016), algas e peixes filtradores (SHEN *et al.*, 2020).

Os ganhos econômicos relacionados a biorremediação também são inegáveis. Por exemplo, em um cultivo de ostras realizado em um estuário urbano dos EUA, foi estimado que a remoção de nitrogênio que é convertido em matéria representa de \$8.5 a \$469 milhões por ano, para a produção atual e expandida, respectivamente (BRICKER *et al.*, 2018). Neste sentido, a biorremediação através do manejo de populações de moluscos bivalves se mostra como uma técnica prática, eficiente, sustentável, economicamente vantajosa e com benefícios para a saúde pública (BIANCHI *et al.*, 2014; BRICKER *et al.*, 2018; GÉBA *et al.*, 2020a; GÉBA *et al.*, 2020b; ISMAIL *et al.*, 2015; ISMAIL *et al.*, 2016; LARA *et al.*, 2002; MEZZANOTTE *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2020).

Bivalve	Ecossistema	Microrganismo (ou vírus) depurado		Referência
				ISMAIL <i>et al.</i> , 2015
Anodonta californiensis	Dulcícola	Bactéria	Escherichia coli	ISMAIL et al

Quadro 1. Diferentes espécies de bivalves eficientes na biorremediação de vírus, bactérias e protozoários.

ISMAIL *et al.*, 2016

Corbicula flumínea	Dulcícola	Bactéria	Escherichia coli	ISMAIL <i>et al.</i> , 2016
Diplodon chilensis	Dulcícola	Bactéria	Coliformes totais e termotolerantes	LARA <i>et al.</i> , 2002
			Bactérias entéricas	BIANCHI <i>et al.,</i> 2014
	a Dulcícola	Vírus entéricos	Poliovírus e Rotavírus	MEZZANOTTE et al., 2016
Dreissena		Bactéria	Escherichia coli	MEZZANOTTE et al., 2016
polymorpha		Destanta (ris	Toxoplasma gondii e Giardia duodenalis	GÉBA <i>et al.,</i> 2020ª
		Protozoario	Cryptosporidium parvum e Toxoplasma gondii	GÉBA <i>et al.,</i> 2020b
Mytilopsis leucophaeata	Estuarino	Bactéria	Coliformes totais e Escherichia coli	NEVES <i>et al.,</i> 2020

Além da biorremediação, os bivalves apresentam características desejáveis para aplicação em biomonitoramento, isto é, a avaliação ambiental a partir de seres vivos locais. Os bivalves são sésseis na fase adulta e, em geral, são bastante tolerantes às variações das condições ambientais (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b). Como filtradores, podem acumular várias classes de poluentes, incluindo bactérias, fornecendo um quadro de sua biodisponibilidade no local. Assim, tem-se proposto a utilização dos bivalves como bioindicadores para estimar tanto o grau

de contaminação ambiental, quanto os efeitos de poluentes na biota (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b).

Os bivalves podem ser utilizados para monitorar de forma eficiente a concentração ambiental (biodisponibilidade) de metais, hidrocarbonetos, poluentes emergentes (produtos farmacêuticos, biocidas, microplásticos, dentre outros), além de bactérias e outros microrganismos (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022a; 2022b). Além disso, os bivalves expostos a contaminantes podem apresentar alterações em vários níveis biológicos, dependendo da concentração e características químicas do contaminante, sem contar o tempo de exposição (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b). Assim, as respostas biológicas dos bivalves também podem ser medidas, fornecendo informações robustas sobre a contaminação da zona costeira (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b).

Alterações biológicas causadas por poluentes podem ser usadas como biomarcadores para monitoramento de contaminação. Para tanto, essas alterações precisam ser mensuráveis em relação à toxicidade do poluente e ao grau de exposição (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b). Assim, os biomarcadores podem incluir a avaliação da concentração tecidual dos contaminantes; alterações nos níveis molecular, celular e histológico; e efeitos sistêmicos no organismo, como fisiologia, comportamento, reprodução, crescimento e sobrevivência (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2022b).

Os bivalves também podem ser fonte de compostos antimicrobianos e outras moléculas bioativas de interesse humano. Esses moluscos estão em contato direto, constantemente, com bactérias suspensas na coluna d'água, sejam elas nativas ou introduzidas no sistema aquático (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). Para prosperar em um ambiente rico em bactérias, os bivalves contam com um robusto sistema imunológico inato baseado em respostas celulares e humorais (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). Assim, para compensar a falta de um sistema imune adaptativo, a maioria dos invertebrados marinhos, incluindo os bivalves, recorre à produção de uma enorme gama de metabólitos antimicrobianos (NALINI *et al.*, 2018).

Muitas das moléculas antimicrobianas produzidas pelos bivalves incluem proteínas ou peptídeos e podem ser estudadas por abordagens proteômicas (GERDOL E VENIER, 2015; NALINI *et al.*, 2018; SOUSA E HINZMANN, 2020). Desta forma, os perfis proteicos de organismos expostos a diferentes condições

podem ser comparados, a fim de identificar mudanças na expressão de proteínas, quantitativa e qualitativamente (CAMPOS *et al.*, 2012; GONZALEZ E PIERRON, 2015). A partir disso, é possível entender as respostas dos organismos a níveis moleculares, bem como apontar moléculas bioativas de interesse humano (por exemplo, novos compostos para a indústria farmacêutica) (NALINI *et al.*, 2018; SOUSA E HINZMANN, 2020). As proteínas podem, ainda, ser usadas como biomarcadores moleculares relacionados aos efeitos biológicos de estressores, incluindo a exposição a bactérias. Desta forma, pode ser útil para o monitoramento ambiental, sem falar na avaliação do estado de saúde e/ou segurança alimentar em espécies comerciais (CAMPOS *et al.*, 2012; GONZALEZ E PIERRON, 2015).

O estudo dos processos biológicos dos bivalves e de sua interação com microrganismos (por exemplo, bactérias nativas e introduzidas em ecossistemas aquáticos) pode apoiar o desenvolvimento de estratégias e ferramentas para serem aplicadas em soluções ambientais na gestão dos recursos marinhos costeiros e contribuir para a sustentabilidade desses ecossistemas, além da exploração de moléculas de interesse humano.

1.4 O MEXILHÃO *Perna perna* E SUA IMPORTÂNCIA AMBIENTAL E SOCIOECONÔMICA

O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), também conhecido como mexilhão marrom ou marisco preto, é um bivalve marinho que habita áreas costeiras das regiões quentes e temperadas dos oceanos atlântico e Índico, além do Mar mediterrâneo (CALVO-UGARTEBURU *et al.,* 2017; CUNHA *et al.,* 2014; LOURENÇO *et al.,* 2012; NARVÁEZ *et al.,* 2008). O mexilhão é considerado uma espécie engenheira, visto que desemprenha serviços ecossistêmicos fundamentais (GOSLING, 2015; LATHLEAN E MCQUAID, 2017; VAUGHN E HOELLEIN, 2018).

O papel ecológico dos bivalves inclui formação de substrato de fundo, por exemplo, grandes bancos e recifes naturais. Estes locais sustentam uma grande diversidade de organismos associados, atuando como "*hotposts*" de diversidade e berçário para outras espécies (LATHLEAN E MCQUAID, 2017; BRICKER *et al.*, 2018; OLIVIER *et al.*, 2018; VAUGHN E HOELLEIN, 2018). Além disso, através de seu processo de filtração, os bivalves reduzem a carga de microrganismos e nutrientes da coluna d'água. Como consequência, controlam a turbidez e a

disponibilidade de nutrientes, regulando populações indiretamente (BRICKER *et al.*, 2018; OLIVIER *et al.*, 2018; VAUGHN E HOELLEIN, 2018).

Como recurso pesqueiro, o *P. perna* é considerado uma espécie essencial para a maricultura mundial, uma vez que é extraído e cultivado em países como África do Sul, Venezuela e Brasil (BRAVO *et al.*, 2003; CALVO-UGARTEBURU *et al.*, 2017; NARVÁEZ *et al.*, 2008; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). No Brasil, o cultivo de mariscos representa 2,9% (20.699 t) da produção total da aquicultura (707.461 t; FAO, 2014). As principais regiões produtoras são a Sudeste e a Sul, e nesta última, se localiza o principal estado produtor do país - Santa Catarina (SC). Este estado responde por cerca de 95% da produção de bivalves cultivados no país, incluindo o mexilhão *Perna perna* (EPAGRI, 2018; SUPLICY *et al.*, 2015). Em 2016, foi estimado que a produção de moluscos alcançou 15.381 t em Santa Catarina – das quais 81,5% corresponderam a mexilhões - gerando US\$ 55 milhões (12.534 t; EPAGRI, 2018). Além disso, ao longo de toda a cadeia produtiva, desde a fabricação de equipamentos e cultivo até a distribuição ao consumidor final, a malacocultura em Santa Catarina sustenta cerca de 5.000 postos de trabalho (EPAGRI, 2013; EPAGRI, 2018; SUPLICY *et al.*, 2015).

A mitilicultura no Brasil é realizada predominantemente em cultivos artesanais, inclusive por populações tradicionais (EPAGRI, 2013; EPAGRI, 2018; SOUZA *et al.*, 2017; SUPLICY *et al.*, 2015). O estado de Santa Catarina tem concentrado esforços para modernizar e padronizar processos ao longo da cadeia de produção da mitilicultura, visando o controle sanitário dos produtos. Entretanto, diversas áreas de cultivo e extração de bivalves estão localizadas em sistemas costeiros contaminados, como a Baía de Guanabara no Estado do Rio de Janeiro (GALVÃO *et al.*, 2015; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2017). Nessa baía, cerca de 50 a 100 trabalhadores estão envolvidos no cultivo e extração de mexilhões *P. perna*, produzindo aproximadamente 20-65 t mensais *in natura* (LAGE E JABLONSKI, 2008).

As regiões Sudeste e Sul do Brasil, onde as áreas de cultivo e extração de bivalves se concentram, apenas 58% e 65% da população possui tratamento de esgoto adequado, respectivamente (ANA, 2021). Como consequência da deficiência de saneamento básico, as áreas de cultivo e extração de mexilhões podem ser afetadas pela contaminação fecal (EPAGRI, 2013; EPAGRI, 2018; SUPLICY *et al.*, 2015). Devido ao hábito de alimentação por filtração, bivalves

cultivados em áreas contaminadas por efluentes podem atuar como veículos de contaminação para os seres humanos, representando uma grande preocupação para a saúde pública (D'MELLO, 2003; LINO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018; SHUVAL, 2003).

Ademais, o despejo de efluentes próximo às áreas de cultivo pode promover maior suscetibilidade dos mexilhões a doenças e infecções, podendo culminar em mortalidade em massa e prejuízos econômicos (LOKMER E WEGNER, 2015; MILAN *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2012; SUÁREZ-MORALES *et al.*, 2010). Desta forma, compreender melhor o funcionamento do sistema imune de bivalves e, ainda, sua interação com bactérias provenientes de efluentes urbanos, pode auxiliar não só em sua aplicação na biorremediação ambiental, como também no manejo desses animais em ambientes naturais e de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune celular e molecular do mexilhão *Perna perna* frente ao desafio com bactérias introduzidas - *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* – e nativa do ambiente marinho - *Vibrio parahaemolyticus*, a fim de explorar possíveis ferramentas biotecnológicas, como biomarcadores celulares e moleculares relacionados à exposição de bactérias e a descoberta de moléculas de interesse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os mecanismos de defesa dos hemócitos do mexilhão *P. perna* frente a exposição às bactérias *E. coli*, *S. enterica* e *V. parahaemolyticus*, buscando marcadores da resposta celular aplicáveis no gerenciamento e manejo deste recurso pesqueiro quando exposto a bactérias.

2. Determinar o perfil proteico de mexilhões *P. perna* desafiados com as bactérias *E. coli*, *S. enterica* e *V. parahaemolyticus*, visando encontrar moléculaschave de defesa contra bactérias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DOS MEXILHÕES Perna perna

As coletas foram realizadas na Praia Vermelha (PV), Rio de Janeiro, RJ (22° 57' 18.59'' S 43° 9' 52.91'' W). A praia, localizada na boca da Baía de Guanabara, possui hidrodinâmica moderada e está localizada no bairro da Urca (Figura 1), logo ao lado do Monumento Natural dos Morros Pão de Açúcar e da Urca. De acordo com o monitoramento realizado pelo Laboratório de Microbiologia da Águas (LACQUA/UNIRIO), no período de 2014 a 2020, a praia apresenta balneabilidade excelente (KREPSKY *et al.*, 2020).

Os mexilhões (70-100 mm de comprimento) foram coletados aleatoriamente do costão rochoso, com o auxílio de uma espátula, e transportados ao laboratório em containers de 20 L contendo água do mar da própria praia (SILVA DOS SANTOS *et al.,* 2018). As Características anatômicas externas e internas do mexilhão *Perna perna* são apresentadas na figura 2.



Figura 1. Localização da Praia Vermelha (PV), Rio de Janeiro, RJ.



Figura 2. Características anatômicas externas e internas do mexilhão Perna perna.

3.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

E. coli 2348/EPEC e S. enterica 1344 foram cultivadas em Tryptic Soy Broth (TSB; 17 g de triptona, 3 g de peptona de soja, 2,5 g de glicose, 2,5 g de fosfato dipotássico e 5 g de cloreto de sódio para 1 L) a 37°C por 20 h, isto é, ainda na fase de crescimento exponencial bacteriano. Nas mesmas condições, V. parahaemolitycus ATCC 17802 foi incubada em Água Peptonada Alcalina 1% (1% peptona e 1% NaCl). Para o ensaio descrito no tópico 3.3, as bactérias foram lavadas uma vez por centrifugação a 3000 g, 12° C durante 10 min e ressuspensas em PBS-NaCl (pH 7,2; PARISI et al., 2008). Para o experimento apresentado no tópico 3.4, as suspensões bacterianas foram preparadas a partir de centrifugação (3000 g; 15° C; 10 min) e ressuspensão, duas vezes, em PBS-NaCI (pH 7,4; PARISI et al., 2008). As concentrações das suspensões bacterianas foram obtidas usando a Escala McFarland. As cepas supracitadas foram obtidas do Laboratório de Enteropatógenos, Microbiologia Veterinária, Ambiental de е Alimentos/Departamento de Microbiologia Parasitologia/Instituto е Biomédico/Universidade Federal Fluminense – UFF; Laboratório de Cocos Patogênicos e Microbiota/Departamento de Microbiologia Médica/Instituto de

Microbiologia Professor Paulo de Goés/Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; e Laboratório de Enterobactérias/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, respectivamente.

3.3 ENSAIO DE DESAFIO BACTERIANO "*in vivo*" PARA ANÁLISE HEMOCITÁRIA

3.3.1 DESENHO EXPERIMENTAL E DESAFIO BACTERIANO

Os mexilhões (n = 80) foram coletados conforme apresentado no tópico 3.1. No laboratório, os animais foram limpos para remoção de organismos incrustantes e mantidos durante 24 h em aquários de 40 L contendo água do mar artificial (Ocean Tech Reef Active; salinidade \approx 29), com aeração constante a 20 °C, para aclimatação. Posteriormente, os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n = 15), representando as seguintes condições: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); *Escherichia coli* (EC); *Salmonella enterica* (SE); e *Vibrio parahaemolitycus* (VP). Os mexilhões dos grupos desafiados, isto é, injetados com bactérias, receberam 100 µL de suspensão bacteriana na concentração 1,5 x 10⁷ UFC mL⁻¹ (tópico 3.2) em seu músculo adutor posterior (Figura 2) com o auxílio de uma seringa estéril (PARISI *et al.*, 2008). Já os grupos controle não-injetado (CN) e controle injetado (CI) compreenderam, respectivamente, mexilhões não desafiados e injetados com 100 µL de PBS-NaCI estéril (PARISI *et al.*, 2008).

Em seguida, os mexilhões foram distribuídos em aquários separados, de acordo com cada condição. Os aquários foram preenchidos com 3 L de água do mar artificial (Ocean Tech Reef Active; salinidade = 29) e mantidos em aeração constante a 18 °C. Após 4h das injeções, foi realizada a extração da hemolinfa (tópico 3.3.2), onde as amostras individuais foram reunidas para compor 5 "*pools*" de aproximadamente 1,5 mL, para cada condição testada. Parte deste volume foi destinado à avaliação dos parâmetros hemocitários por citometria de fluxo e a outra parte à quantificação de bactérias viáveis remanescentes (PARISI *et al.*, 2008; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018).

3.3.2 EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA

Com o auxílio de uma seringa estéril (3 mL) acoplada a uma agulha de 21 G, a hemolinfa foi extraída a partir do músculo adutor posterior dos mexilhões (Figura 2; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). As amostras individuais (0,5–2 mL) foram mantidas refrigeradas até o uso, para minimizar a aglomeração celular (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). A fim de excluir amostras de baixa qualidade (por exemplo, com gametas, restos de tecido, dentre outros), as mesmas foram avaliadas a olho nu e com o auxílio de um microscópio ótico. As amostras consideradas puras foram reunidas em "*pools*" para reduzir a variação interindividual e fornecer volume suficiente para todas as análises (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). Foram preparados 5 "*pools*" de hemolinfa por condição, onde aproximadamente 1 mL seguiu para a análise em citometria de fluxo e 0,5 mL para a quantificação de bactérias viáveis.

3.3.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMOCITÁRIOS

Os parâmetros hemocitários - densidade, atividade fagocítica, tamanho relativo, complexidade interna relativa e produção de ROS - foram avaliados com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, Bioscience, EUA) equipado com um laser de argônio (488 nm). O tamanho relativo celular foi estimado através do diodo *"Forward Scatter"* (FSC) e a complexidade interna relativa usando o sensor *"Side Scatter"* (SSC). Os demais parâmetros foram aferidos a partir de sondas moleculares e pela fagocitose de microesferas fluorescentes. Após o tempo de incubação com cada marcador molecular, as reações foram interrompidas em gelo e a fluorescência foi registrada em um comprimento de onda FL1–SP 530/30 nm (fluorescência verde e verde-amarelo). Os *"pools"* amostrais (n = 5 por condição) acondicionados em tubos de citometria de fluxo de 5 mL foram avaliadas em fluxo *"high"* por 1 min. O fluxo do citômetro (volume min⁻¹) ao longo da leitura foi determinado pela contagem de células de uma cultura cuja densidade foi previamente estabelecida por microscopia óptica invertida.

Para analisar a morfologia e densidade dos hemócitos, foram retirados 250 μ L de cada "*pool*" de hemolinfa. A esse volume foram adicionados 250 μ L de solução antiagregante Alsever (27 mM de citrato de sódio, 145 mM de NaCl, 115 mM de glicose, 9 mM de EDTA em água destilada - pH 7,0; REBELO *et al.*, 2013) e 10 μ L de uma solução de SYBR Green I com diluição 10⁻² (solução original
10.000x, Sigma-Aldrich, EUA; HÉGARET *et al.*, 2003). Os tubos foram incubados no escuro por 30 min a 22 °C até a leitura (DONAGHY *et al.*, 2009; 2010). A população total de hemócitos foi discriminada utilizando um gráfico "*dot plot*" a partir dos parâmetros morfológicos relativos de citometria de fluxo SSC e FSC em escala logarítmica (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). Para discriminar detritos de hemócitos, foi utilizado um gráfico "*dot plot*" da fluorescência de SYBR Green I (FL1) "*versus*" FSC (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). Os resultados morfológicos foram expressos em unidades arbitrárias (UA) e a densidade de hemócitos (células mL⁻¹) foi calculada de acordo com o número de células contadas por minuto no fluxo previamente determinado (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018).

A atividade fagocítica foi estimada pela densidade de hemócitos (células mL⁻¹) que engolfaram uma ou mais esferas fluorescentes de látex (Fluoresbrite Yellow Green Microspheres, 2 µm, Polysciences, Alemanha). Para isso, 250 µl de hemolinfa foram retirados de cada "*pool*" e misturados a 20 µl de solução de esferas fluorescentes (diluição 10x; DONAGHY *et al.*, 2009; LABREUCHE *et al.*, 2006b). As amostras foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente (22 °C) no escuro. Imediatamente antes da leitura em citômetro de fluxo, foram adicionados 250 µl de água do mar estéril filtrada (Millipore Glass Fiber Filter, Millipore AP-40, Millipore Brasil; DONAGHY *et al.*, 2009; LABREUCHE *et al.*, 2006b). A fluorescência verdeamarela (FL1) de uma ou mais esferas interiorizadas foi utilizada para identificar a densidade de hemócitos com atividade fagocítica a partir do cálculo adaptado de DELAPORTE *et al.*, (2003).

A produção de ROS foi estimada utilizando o marcador molecular DCFH-DA (diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína, Sigma-Aldrich-EUA) a partir do método adaptado de LAMBERT *et al.*, (2003). O DCFH-DA é uma sonda não fluorescente permeável à membrana. Uma vez no interior das células, o marcador é oxidado à molécula fluorescente DCF (diclorofluoresceína) de acordo com a atividade oxidativa total dos hemócitos, que ocorre principalmente pela produção de espécies reativas oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (DELAPORTE *et al.*, 2006; DONAGHY *et al.*, 2010). Desta forma, a oxidação do DCFH-DA pode ser quantitativamente correlacionada à produção de ROS (DELAPORTE *et al.*, 2006; DONAGHY *et al.*, 2010). A partir de cada "*pool*" de hemolinfa, 250 µl foram retirados e misturados a 250 µl de água do mar filtrada estéril e 5 µl de DCFH-DA (concentração final 10 µM; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). As amostras foram incubadas por 2 h à

temperatura ambiente (22 ° C) no escuro (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). A atividade oxidativa relativa foi expressa como a intensidade de fluorescência verde (FL1 – 710 nm) e foi calculada como a média geométrica de FL1 em unidades arbitrárias (UA) (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018).

3.3.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS REMANESCENTES NA HEMOLINFA

A partir de cada "*pool*", 250 µl foram reservados para a quantificação de bactérias remanescentes na hemolinfa total, 4h após as injeções. A hemolinfa foi mantida em gelo até ser plaqueada por "*spread-plate*" em dois meios de cultura distribuídos em placas estéreis de 6 poços (SPL Life Sciences): Ágar Salmonella Shigella (SS, Kasvi) e Ágar Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS, Neogen). O primeiro indica a presença de *E. coli* e Salmonella spp. e o segundo é seletivo para Víbrio spp. As placas contendo ambos os meios de cultura foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O crescimento de colônias cor-de-rosa a vermelhas em Ágar SS indicou a presença de cepas enteropatogênicas de *E. coli*. Colônias bege com centros pretos, também em Ágar SS, são típicas de Salmonella spp. Em Ágar TCBS, colônias verdes a verdes-azuladas em meio praticamente inalterado indicaram a presença de *V. parahaemolyticus*. Após o tempo de incubação, as colônias foram contadas e o número de bactérias remanescentes na hemolinfa de *P. perna* foi relatado como Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC mL⁻¹).

3.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Análise Multivariada Permutacional de Variância (PERMANOVA) foi aplicado para avaliar a resposta imune celular frente às cinco condições testadas (controle não-injetado - CN; controle injetado - CI; Escherichia coli - EC; Salmonella enterica - SE; e Vibrio parahaemolitycus - VP) através dos seguintes parâmetros hemócitários: densidade. atividade fagocítica, tamanho relativo (FSC), complexidade interna relativa (SSC) e produção de ROS. O teste PERMANOVA "one-way" foi baseado em distâncias euclidianas e 9999 permutações (ANDERSON, 2005). Por conseguinte, as diferenças significativas entre as condições foram analisadas a partir de teste um PERMANOVA "pair-wise" com 9999 permutações (ANDERSON, 2005). O teste foi realizado com o auxílio do "software" PERMANOVA 1.6 (ANDERSON, 2005) e os gráficos construídos a partir do "*software*" GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad), onde os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

3.4 ENSAIO DE DESAFIO BACTERIANO "*in vivo*" PARA ANÁLISE PROTEÔMICA

3.4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E DESAFIO BACTERIANO

Os mexilhões foram coletados, conforme detalhado no tópico 3.1. No laboratório, os animais foram limpos, separados e desafiados de forma semelhante ao desenho experimental descrito no tópico 3.3.1. Os indivíduos foram agrupados (n = 9) nas seguintes condições: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); Escherichia coli (EC); Salmonella enterica (SE); e Vibrio parahaemolitycus (VP). A respectiva suspensão bacteriana (100 µL de 1,5 x 107 UFC mL-1/ tópico 3.2) foi injetada no músculo adutor posterior dos mexilhões dos grupos desafiados com bactérias (PARISI et al., 2008; WU et al., 2013). Mexilhões não desafiados e injetados com 100 µL de PBS-NaCl estéril corresponderam, respectivamente, aos grupos controle não-injetado (CN) e controle injetado (CI) (PARISI et al., 2008; WU et al., 2013). Após as injeções, os mexilhões (n=9) foram acondicionados em aquários separados, de acordo com cada condição. Os aquários foram preenchidos com 3 L de água do mar filtrada da PV (20 µm; salinidade = 30,9) e mantidos em aeração constante a 18 °C. Os mexilhões foram dissecados, utilizando bisturi estéril e pinça de aço inoxidável, 24h após a injeção para remoção do hepatopâncreas (Figura 2; WU et al., 2013). Estes foram acondicionados individualmente em tubos "Eppendorf" estéreis (2 mL), congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer (-20 °C) até serem liofilizados (WU et al., 2013).

3.4.2 EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As amostras liofilizadas foram adicionadas a microtubos contendo 500 µL de tampão de extração (2 M tioureia, 7 M ureia, 4% CHAPS, 50 mM tris-HCl; pH = 8,5), 5 µL de inibidor de protease e *beads* de cerâmica (mescla de 1,4 mm e 2,8 mm). Os tubos foram levados ao homogeneizador mecânico FastPrep – 24^{TM} 5G (MP Biomedicals), com a seguinte programação: velocidade = 6,5 m/s; adaptador = *coolprep*; tempo = 40 seg. O programa foi executado 3 vezes nas condições acima,

com intervalos de 30 s e adição de gelo seco. Uma vez que as amostras não estavam líquidas o suficiente, o processo acima foi repetido adicionando a mesma quantidade de tampão de extração e inibidor de protease.

Após a completa homogeneização, igual volume de solução de ácido tricloroacético/acetona (20/80) foi adicionado às amostras, que precipitaram a 4 °C por 45 min. As amostras foram, então, centrifugadas a 20.000 g e 4 °C por 50 min, e lavadas 5 vezes com solução de acetona/tris-HCl 6.8 100mM (70/30) adicionada de indicador de pH azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram redissolvidas no tampão de extração (500 μ L) adicionado de 1% de inibidor de protease e diluídas 100 vezes para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Com base na concentração de proteínas, amostras de cada condição experimental foram escolhidas (IC, EC e SE: n = 5 e NC e VP: n = 4) para prosseguir para as próximas etapas.

A partir de cada amostra, o volume necessário para a obtenção de 10 µg de proteínas totais foi transferido para tubos limpos e então as amostras foram reduzidas com 6 µL de ditiotreitol (concentração final 50 mM) por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, 14 µL de acrilamida 30% foram adicionados às amostras (concentração final 20%). Após agitação por 20 min, 5µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 5 µL de peroxidisulfato de amônio 10% foram adicionados a cada tubo para polimerização do gel. Em seguida, as amostras foram fixadas com 100 µL de solução de metanol, ácido acético e H₂O (50/40/10) por 10 min. Cerca de 500 µL de uréia (6 M) foram adicionados a cada tubo e, após 10 min de agitação, foram adicionados também 250 µL de acetonitrila. Os tubos foram agitados no vórtex e o líquido removido. As amostras foram reidratadas em 200 µL de bicarbonato de amônio (100 mM) e incubadas por 10 min sob agitação. Um volume igual de acetonitrila (200 µL) foi adicionado e, em seguida, os tubos foram agitados no vórtex e o líquido removido. Novamente, 200 µL de acetonitrila foram adicionados e, após a desidratação completa da amostra, o líquido foi removido e as amostras foram deixadas para secar ao ar. De cada amostra, foram separados 5 µg de proteínas utilizando um protocolo de preparação de amostras auxiliado por gel modificado (FISCHER E KESSLER, 2015). As amostras foram digeridas com tripsina/Lys-C overnight a 37°C. Para a fragmentação nano-LC, as amostras de proteínas/peptídeos foram primeiro dessalinizadas e concentradas em um µC18 Omix (Agilent).

3.4.3 ANÁLISE LC-MS/MS

A etapa de cromatografia foi realizada em um sistema de nanofluxo de ultraalta pressão NanoElute (Bruker Daltonics). Aproximadamente 200 ng de cada amostra de peptídeo foram concentrados em uma pré-coluna C18 pepmap 100 (5 mm x 300 µm i.d.) (Thermo Scientific) e separados a 50 °C em coluna Reprosil de fase reversa (25 cm x 75 µm i.d.), embalada com esferas de sílica porosa revestidas com C18 de 1,6 µm (lonopticks). As fases móveis consistiram em 0,1% de ácido fórmico em 99,9% de água (v/v) (A) e 0,1% de ácido fórmico em 99,9% de acetonitrila (v/v) (B). A taxa de nanofluxo foi ajustada em 250 nl/min, e o perfil de gradiente como segue: de 2 a 30% de B em 70 min, seguido por um aumento para 37% de B em 5 min e, posteriormente, para 85% de B em 5 min e reequilíbrio. As análises de MS foram realizadas em um espectrômetro de massa TIMS-TOF pro (Bruker Daltonics) com uma fonte de íons nanoeletrospray modificada (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). Para ionização, foi aplicada uma voltagem de pulverização de 1400 com uma temperatura capilar de 180°C. Os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo na faixa de massa de 100 a 1700 m/z e janela de 0,60 a 1,60 1/k0. O espectrômetro de massa foi operado no modo PASEF DIA com exclusão de peptídeos de carga única. O esquema de aquisição DIA consistiu em 16 janelas variáveis de 400 a 1200 m/z.

3.4.4 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A busca no banco de dados e a quantificação LFQ ("Label Free Quantitation" XIC) foram realizadas através do DIA-NN (versão usando 1.8; https://www.nature.com/articles/s41592-019-0638-x). Um banco de dados atualizado do UniProt de Mytilus coruscus foi utilizado para pesquisa/geração de biblioteca "library-free". Na ausência de banco de dados genômicos da espécie Perna perna ou dentro do gênero Perna, Mytilus coruscus foi a espécie mais próxima de Perna perna (mesma subfamília, Mytilinae) com o proteoma disponível mais completo (LI et al., 2020). O parâmetro padrão 0,0 foi usado para previsão de RT e acurácia de massa de extração, o que significa que o DIA-NN realizou correção automática de massa e RT. Os seis principais fragmentos (classificados por suas intensidades de biblioteca) foram usados para identificação e quantificação de peptídeos. O FDR foi ajustado para 1% no nível do peptídeo precursor. As modificações variáveis permitidas foram as seguintes: N-termacetilação e Oxidação (M). Além disso, a C-propionoamida foi definida como modificação fixa. "Trypsin/P" foi selecionado. Os dados foram filtrados de acordo com um FDR de 1%. A normalização cruzada foi realizada usando RT-dependente.

3.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos "*label-free*" foram importados para o "*software*" Perseus 1.6.15.0 (TYANOVA *et al.*, 2016). Os valores de intensidade de proteína foram transformados em log2 e apenas proteínas identificadas em um mínimo de três amostras de pelo menos uma das condições testadas (controle não injetado -CN; controle injetado - CI; *Escherichia coli* - EC; *Salmonella enterica* - SE; e *Vibrio parahaemolitycus* - VP) seguiram para posterior análise. Os valores perdidos foram substituídos da distribuição normal ("*width*" = 0,3 e "*downshift*" = 1,8).

Os perfis de resposta das diferentes condições foram comparados a partir de um teste ANOVA "one-way" (Benjamini-Hochberg FDR; significância $\geq 0,05$) seguido do teste de Tukey HSD (significância $\geq 0,05$). A anotação funcional das proteínas foi realizada usando as ferramentas UniProt (https://www.uniprot.org/) e "EggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale" (http://eggnog-mapper. embl.de/; CANTALAPIEDRA et al., 2021). O papel biológico das proteínas significativamente diferentes frente ao desafio bacteriano foi discutido levando em consideração as categorias de "Clusters of Orthologous Group (COG)", "Gene Ontology (GO) terms" de processos biológicos e revisão da literatura.

O gráfico "*UpSet*" para visualizar os conjuntos de interseção de proteínas significativamente diferentes entre as condições testadas foi criado usando o pacote UpSetR disponível em https://upset.app/ (CONWAY *et al.*, 2017; LEX, 2014).

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO DE DESAFIO BACTERIANO "*in vivo*" PARA ANÁLISE HEMOCITÁRIA

Os parâmetros hemocitários aferidos 4 horas após as injeções com as bactérias de interesse (*Escherichia coli* - EC; *Salmonella enterica* - SE; e *Vibrio parahaemolitycus* - VP), além dos controles (Controle não-injetado - CN e Controle injetado - CI), são apresentados na Tabela 1 e na Figura 3. A densidade dos hemócitos dos mexilhões desafiados com *E. coli* (EC) e *V. parahaemolitycus* (VP) foi significativamente maior em comparação aos mexilhões injetados com *S. enterica* (SE) e PBS-NaCl estéril (CI), que por sua vez, apresentaram densidade significativamente mais elevada que o controle não-injetado (CN) (one-way PERMANOVA, F_{4,25} = 7.37, p = 0.002).

O controle não-injetado (CN) apresentou atividade fagocítica significativamente menor que os grupos desafiados com *E. coli* (EC) e *V. parahaemolitycus* (VP). Já os mexilhões dos grupos controle-injetado (CI) e desafiados com *S. enterica* (SE) apresentaram fagocitose hemocitária intermediária entre os grupos controle não-injetado (CN) e injetados com *E. coli* (EC) (one-way PERMANOVA, $F_{4,25} = 10.62$, p = 0.0007).

Em relação à morfologia dos hemócitos, o tamanho relativo (FSC) nos mexilhões desafiados com *V. parahaemolitycus* (VP) foi significativamente maior que todos os outros grupos (Controle não-injetado - CN; Controle injetado - CI; *Escherichia coli* - EC; *Salmonella enterica* - SE) (one-way PERMANOVA, $F_{4,25} = 21.02$, p = 0.0002). Já a complexidade interna relativa (SSC) do grupo desafiado com *E. coli* (EC) foi significativamente menor que os grupos controle injetado (CI), *Salmonella enterica* (SE) e *V. parahaemolitycus* (VP) (one-way PERMANOVA, $F_{4,25} = 4.41$, p = 0.0116).

A produção de ROS dos hemócitos dos mexilhões do grupo controle nãoinjetado (CN) foi significativamente menor em comparação aos mexilhões injetados com *S. enterica* (SE), que por sua vez, foi menor que o grupo controle injetado (CI). Os grupos desafiados com *E. coli* (EC) e *V. parahaemolitycus* (VP) apresentaram produção de ROS intermediária entre o controle não-injetado (CN) e o grupo desafiado com *S. enterica* (SE) (one-way PERMANOVA, F_{4,25} = 10.50, p = 0.0002).

Tabela 1. Parâmetros imune-celulares (média ± desvio padrão) mensurados a partir de hemolinfa de *Perna perna* de acordo com cada condição testada: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); *Escherichia coli* (EC); *Salmonella enterica* (SE); e *Vibrio parahaemolitycus* (VP).

	Parâmetros hemocitários									
	Densidade (cel mL ⁻¹)	Fagocitose (cel mL ⁻¹)	FSC (U.A.)	SSC (U.A.)	ROS (U.A.)					
CN	2,06 x 10 ⁴ ± 1,15 x 10 ⁴	1,60 x 10 ⁴ ± 7,26 x 10 ³	209,6 ± 32,9	$3,2 \pm 0,6$	29,9 ± 4,8					
CI	7,90 x $10^4 \pm 2,56 \times 10^4$	2,81 x 10 ⁴ ± 6,99 x 10 ³	$206,0 \pm 8,6$	3,1 ± 0,2	$65,2 \pm 8,4$					
EC	2,91 x 10 ⁵ ± 1,73 x 10 ⁵	$4,53 \ge 10^4 \pm 1,21 \ge 10^4$	199,3 ± 21,1	$2,4 \pm 0,2$	33,9 ± 11,4					
SE	7,58 x $10^4 \pm 4,20 \times 10^4$	$3,66 \ge 10^4 \pm 1,70 \ge 10^4$	208,7 ± 15,1	$2,8 \pm 0,2$	$46,7 \pm 4,8$					
VP	1,90 x 10 ⁵ ± 8,46 x 10 ⁴	$6,48 \ge 10^4 \pm 1,08 \ge 10^4$	300,1 ± 14,7	$3,0 \pm 0,1$	$43,4 \pm 14,3$					



Figura 3. Parâmetros hemocitários mensurados a partir da hemolinfa do mexilhão *Perna perna* de acordo com cada condição testada: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); Escherichia coli (EC); Salmonella enterica (SE); e Vibrio parahaemolitycus (VP). a) Densidade; b) Atividade fagocítica; c) Tamanho celular relativo (FSC); d) Complexidade intracelular relativa (SSC); e) Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Os

dados são expressos como média \pm desvio padrão (n= 5 por tratamento). As diferenças significativas (p < 0.05) observadas em cada parâmetro de acordo com os diferentes tratamentos estão aqui representadas por letras ou *.

As bactérias viáveis foram quantificadas na hemolinfa dos mexilhões Perna perna após 4 h do desafio bacteriano e são apresentadas na tabela 2 e figura 4. Nenhuma colônia preta, que indica a presença de Salmonella spp., foi encontrada nos controles (CN e CI). Colônias rosadas, que indicam a presenca de cepas enteropatogênicas de E. coli, estavam presentes, apesar de em menor número, nos controles (CN = 4.8 ± 6.6 UFC mL⁻¹; CI = 1.6 ± 3.6 UFC mL⁻¹). Os controles também apresentaram menor número de bactérias totais em Ágar SS (CN = 16,0 ± 9,4 UFC mL⁻¹; CI = 51,2 \pm 8,2 UFC mL⁻¹). Os grupos desafiados com *E. coli* (EC) e *S. enterica* (SE) apresentaram um número elevado de colônias rosadas (EC = 23,2 ± 23,4 UFC mL^{-1} ; SE = 66,4 ± 91,2 UFC mL⁻¹), pretas (EC = 38,4 ± 33,8 UFC mL⁻¹; SE = 137,6 \pm 63,4 UFC mL⁻¹) e totais (EC = 67,2 \pm 36,4 UFC mL⁻¹; SE = 228,8 \pm 59,7 UFC mL⁻¹ ¹) em comparação aos controles. O grupo desafiado com Vibrio parahaemolitycus (VP) apresentou número de colônias extremamente elevado, sendo incontável. Entretanto, além das colônias típicas de Vibrio parahaemolitycus, foram observadas colônias circundadas por zonas amarelas, que indicam a presença de outras espécies de Vibrio (por exemplo, V. cholerae e V. alginolyticus).

Tabela 2. Abundância de bactérias viáveis na hemolinfa do mexilhão *Perna perna* após 4 h do desafio bacteriano (média ± desvio padrão) de acordo com a morfologia das colônias (pretas, rosadas e outras – brancas, incolores e marrons), para as seguintes condições: Controle nãoinjetado (CN); Controle injetado (CI); *Escherichia coli* (EC); *Salmonella enterica* (SE); e *Vibrio parahaemolitycus* (VP).

	Bactérias viávo				
	Pretas	Rosadas	Outras	Total	
CN	$0,0 \pm 0,0$	$4,8 \pm 6,6$	11,2 ± 10,0	$16,0 \pm 9,4$	
CI	$0,0 \pm 0,0$	1,6 ± 3,6	49,6 ± 10,4	51,2 ± 8,2	
EC	38,4 ± 33,8	$23,2 \pm 23,4$	$5,6 \pm 3,6$	67,2 ± 36,4	
SE	137,6 ± 63,4	66,4 ± 91,2	24,8 ± 42,5	228,8 ± 59,7	
VP	-	-	-	-	



Figura 4. Abundância de bactérias viáveis remanescentes na hemolinfa do mexilhão *Perna perna* após 4 h do desafio bacteriano (UFC mL-1) de acordo com as seguintes condições: Controle não-injetado (CN); Controle injetado (CI); *Escherichia coli* (EC); *Salmonella enterica* (SE). Os símbolos representam colônias rosadas (R), pretas (P) e outras (O). Os dados são expressos como médias ± desvio padrão (n = 5 amostras) dos tratamentos acima.

4.2 ENSAIO DE DESAFIO BACTERIANO "*in vivo*" PARA ANÁLISE PROTEÔMICA

Um total de 3.805 proteínas foram encontradas no hepatopâncreas dos mexilhões *Perna perna* submetidos a cinco condições diferentes (controle não injetado - CN; controle injetado - CI; *Escherichia coli* - EC; *Salmonella enterica* - SE; e *Vibrio parahaemolyticus* - VP), sendo 378 ainda não caracterizadas. Do total, 597 foram significativamente diferentes – acumuladas ou reguladas negativamente - em pelo menos uma condição. A Figura 5 mostra o número de proteínas significativamente diferentes para cada grupo-intersecção da comparação por pares entre as diferentes condições. Onze proteínas apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos de controle, provavelmente em resposta ao estresse relacionado à injeção e, por esse motivo, não fazem parte do foco da discussão. Mexilhões injetados com *V. parahaemolyticus* apresentaram uma resposta mais acentuada, com 343 proteínas significativamente diferentes de todas as outras condições. Desta forma, a resposta específica a *V. parahaemolyticus* é apresentada e discutida em tópicos independentes (4.2.4/ 5.2.4). Dentre as demais

proteínas significativamente diferentes, apenas as acumuladas ou reguladas negativamente em relação a ambos os controles (não injetados - CN e injetados - CI) são aqui discutidas, de acordo com cada grupo de desafio bacteriano. A Tabela 3 mostra as 31 proteínas que foram significativamente diferentes - acumuladas ou reguladas negativamente - para um ou mais grupos de desafio bacteriano (*Escherichia coli* - EC; *Salmonella enterica* - SE; e *Vibrio parahaemolyticus* - VP) em comparação com ambos os controles (não injetados - CN e injetados - CI).



Figura 5. Gráfico "*Upset plot*" para visualizar os conjuntos-interseção de proteínas significativamente diferentes entre as condições testadas. CN – Controle não injetado; CI - Controle injetado; EC - *Escherichia coli*; SE - *Salmonella entérica*; e VP - *Vibrio parahaemolitycus*. SE_EC corresponde à diferença significativa entre essas duas condições e assim por diante.

4.2.1 Escherichia coli

Os mexilhões desafiados com *E. coli* apresentaram apenas duas proteínas reguladas negativamente em comparação com os controles, a saber: uma proteína

contendo o domínio "von Willebrand Factor A" (vWA) e uma proteína contendo o domínio FERM ("four-point-one, ezrin, radixin, moesin").

4.2.2 Salmonella enterica

Semelhante aos mexilhões injetados com *E. coli*, a proteína contendo o domínio FERM foi regulada negativamente em mexilhões desafiados por *S. enterica.* Da mesma forma, as proteínas fator de "*splicing*" 3A subunidade 1 (SF3A1), actina beta/gama 1 (ACTB_G1) e galactoquinase 2 (GALK2) foram reguladas negativamente após a injeção de *S. entérica.* Em contrapartida, as seguintes proteínas foram acumuladas: proteína contendo o domínio de repetição rico em leucina e o domínio guanilato quinase (LRGUK), proteína quinase ativada por estresse JNK, proteína ribossomal 60S L18a (RPL18A), ativador de proteassoma PA28γ (PA28γ ou PSME3), proteína 1 do processo de fissão mitocondrial (MTFP1), tubulina de cadeia beta (β-Tubulina), dineínas axonemais (DNAH3 e DNAH9), EFHC1, proteína 299 associada a cílios e flagelos, Glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD2) e Oxoglutarato desidrogenase (OGDHL). No total, foram 16 proteínas significativamente diferentes entre o grupo desafiado com *S. enterica* e os controles.

Intensidade da proteína (Log ₂)					<i>"ID"</i> da	Nome da proteína		Termo " <i>GO</i> "	Papel funcional
CN	CI	EC	SE	VP	coruscus)	Nome da proteina	COG	biológico	discutido
2.38726 (a)	1.3484 (a)	2.10945 (a)	0 (a,b)	-2.38726 (b)	A0A6J8EX32	RCL1	А	GO:0042254	RI: RT
-2.62858 (a)	-1.47506 (a)	-1.37232 (a)	0 (a,b)	2.62858 (b)	A0A6J7ZVU2	THOC1	Y	GO:0007165	RI: TP
-1.60211 (a)	-2.93367 (a)	-2.59738 (a)	0 (a,b)	2.93367 (b)	A0A6J8AQ94	MDH2 (EC 1.1.1.37)	С	GO:0019752	PEM
-1.74661 (a)	-2.12859 (a)	-2.11956 (a)	0 (a,b)	2.12859 (b)	A0A6J8AVB3	HNF4 α or NR2A1	К	GO:0055088	RI: TP
-1.96165 (a)	-2.9873 (a)	-2.95419 (a)	0 (a,b)	2.9873 (b)	A0A6J8AVI6	ARMC3	U	-	RI: CE
-1.83666 (a)	-1.99424 (a)	-1.85217 (a)	0 (a,b)	1.99424 (b)	A0A6J8BYT8	PMPCB (EC 3.4.24.64)	0	GO:0006627	RI: PP
-1.73032 (a)	-2.61043 (a)	-1.48601 (a)	0 (a,b)	2.61043 (b)	A0A6J8DLP9	NUG1	0	GO:0042254	RI: RT
-2.20849 (a)	-2.90543 (a)	-3.19666 (a)	0 (a,b)	3.19666 (b)	A0A6J8EP08	DNAH	Z	-	RI: CE
-1.79806 (a)	-2.75469 (a)	-2.22081 (a)	0 (a,b)	2.75469 (b)	A0A6J8ETV0	DNAH	Z	-	RI: CE
-2.57474 (a)	-2.46286 (a)	-2.64498 (a)	0 (a,b)	2.64498 (b)	A0A6J8EX85	Proteína não caracterizada	-	-	-
-1.53336 (a)	-2.23568 (a)	0 (a,b)	2.23568 (b)	1.95547 (b)	A0A6J8B1G4	β-Tubulin	Z	GO:0005200	RI: CE
							F _		
-1.84442 (a)	-1.87709 (a)	0 (a,b)	1.87709 (b)	1.33182 (b)	A0A6J8C231	LRGUK	I	GO:0016310	RI: RS
-2.08 (a)	-2.38518 (a)	0 (a,b)	2.08434 (b)	2.38518 (b)	A0A6J8DBD6	EFHC1	S	GO:0000226	RI: CE
-2.11222 (a)	-1.8169 (a)	0 (a,b)	2.11222 (b)	2.01685 (b)	A0A6J8DKT3	RPL18A	J	GO:0006412	RI: RT
1.96583 (a)	1.81292 (a)	0 (a,b)	-1.94087 (b)	-1.96583 (b)	A0A6J8DBY2	SF3A1	А	GO:0045292	RI: TP

Tabela 3. Lista de proteínas significativamente diferentes dos controles não injetados (CN) e injetados (CI), identificados no hepatopâncreas de mexilhões *Perna perna após desafio bacteriano - Escherichia coli* (EC), *Salmonella enterica* (SE) e *Vibrio parahaemolyticus* (VP).

PEM	GO:0004591	С	OGDHL (EC 1.2.4.2)	A0A6J8B4X1	0 (a,b)	2.69884 (b)	0 (a,b)	-2.69884 (a)	-1.85751 (a)
PEM	GO:0052590	С	GPD2 (EC 1.1.5.3)	A0A6J8BFT8	0 (a,b)	2.1063 (b)	0 (a,b)	-2.1063 (a)	-1.67409 (a)
RI: PA	GO:0000266	S	MTFP1	A0A6J8BY71	0 (a,b)	2.09925 (b)	0 (a,b)	-2.09925 (a)	-1.99897 (a)
RI: CE	GO:0003341	Z	DNAH9	A0A6J8C994	0 (a,b)	1.74695 (b)	0 (a,b)	-1.74695 (a)	-1.63546 (a)
RI: CE	GO:0000003	Z	DNAH3	A0A6J8D105	0 (a,b)	2.17627 (b)	0 (a,b)	-2.00809 (a)	-2.17627 (a)
PEM	GO:0004335	G	GALK2 (EC 2.7.1.157)	A0A6J8DAJ1	2.11245 (a)	-2.41264 (b)	0 (a,b)	2.41264 (a)	2.3344 (a)
RI: PP	GO:0008537	0	PA28y or PSME3	A0A6J8BGT0	-1.43933 (a)	2.00612 (b)	0 (a,b)	-1.56804 (a)	-2.00612 (a)
			Cilia- and flagella-associated						
RI: CE	GO:0003341	S	protein 299	A0A6J8CT60	-1.45282 (a)	3.12093 (b)	0 (a,b)	-3.12093 (a)	-2.16034 (a)
RI: EH	GO:0006325	В	Histone H2A	A0A6J8EST1	-2.5799 (b)	1.6229 (a)	0 (a,b)	2.5799 (a)	1.83903 (a)
RI: TP	GO:0003723	А	PUF60	A0A6J8AYV2	2.29772 (b)	-2.29772 (a)	0 (a,b)	-1.55342 (a)	-2.0011 (a)
			ABC transmembrane type1						
RI: TT	GO:0055085	Q	domain-containing protein	A0A6J8BVY9	2.82524 (b)	-1.92149 (a)	0 (a,b)	-2.82524 (a)	-1.46088 (a)
			Stress-activated protein kinase						
RI: RS	GO:0006468	Т	JNK (EC 2.7.11.24)	A0A6J8DLC4	0 (a,b)	2.25292 (b)	-2.05586 (a)	-2.25292 (a)	-1.77553 (a)
			FERM domain-containing						
RI: RS/CE	-	Т	protein	A0A6J8C596	2.37932 (a,c)	-3.16862 (b)	-1.89236 (b,c)	3.16862 (a)	2.70474 (a)
RI: EH	-	S	Vwa domain-containing protein	A0A6J8E5Z8	2.24928 (a)	0 (a,b)	-2.24928 (b)	2.00156 (a)	2.05026 (a)
RI: CE	GO:0048870	Z	ACTB_G1	A0A6J8BRN5	3.14933 (a)	-3.14933 (b)	-1.39648 (b,c)	1.60073 (a,c)	1.5336 (a,c)
RI: RS	GO:0004252	Т	RHBDL1_2_3 (EC 3.4.21.105)	A0A6J8EM30	-2.34246 (b)	0 (a,b)	0 (a,b)	2.34246 (a)	2.04012 (a)

RI – Resposta imune (CE - Resposta associada ao citoesqueleto; EF – Efetor humoral; PA – Processos apoptóticos; PP - Processamento proteico; RS – Reconhecimento e transdução de sinal; RT - Estrutura ribossomal e tradução; TP – Transcrição e processamento; TT – Transporte transmembrana) e PEM- Produção de Energia e Metabolismo.

4.2.3 Vibrio parahaemolyticus

Os mexilhões desafiados com V. parahaemolyticus apresentaram o mesmo perfil que os mexilhões injetados com S. enterica para as seguintes proteínas: proteína contendo o domínio de repetição rico em leucina e o domínio guanilato quinase (LRGUK), fator de "splicing" 3A subunidade 1 (SF3A1), proteína ribossomal 60S L18a (RPL18A), β-Tubulina e EFHC1. Isto é, a proteína SF3A1 foi regulada negativamente e todas as outras foram acumuladas em comparação com os controles, assim como no grupo desafiado com S. enterica. Além disso, para mexilhões injetados com V. parahaemolyticus, as proteínas rombóide protease (RHBDL1 2 3), RNA 3-fosfato ciclase tipo 1 (RCL1) e histona H2A foram reguladas negativamente, enquanto as seguintes proteínas foram acumuladas: fator nuclear de hepatócito-4a (HNF4a ou NR2A1), fator de ligação poli-U de 60 kDa (PUF60), THOC1, proteína de ligação a GTP nuclear (NUG1), proteína contendo domínio transmembrana ABC tipo 1, dineínas motoras (DNAH), ARMC3, malato desidrogenase (MDH2) e subunidade beta da peptidase de processamento mitocondrial (PMPCB). Assim, no total foram 19 proteínas significativamente diferentes entre o grupo de mexilhões desafiados com V. parahaemolyticus e os controles (contanto com uma proteína não caracterizada que não foi citada acima).

4.2.4 RESPOSTA ESPECÍFICA A Vibrio parahaemolyticus

Os mexilhões desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* (VP) apresentaram 343 proteínas significativamente diferentes de todas as outras condições (CN - controle não injetado; CI - controle injetado; EC - *Escherichia coli*, SE - *Salmonella enterica*), num total de 597 proteínas que foram significativamente diferentes em pelo menos uma condição. Entre essas 343 proteínas, 327 foram reguladas negativamente, enquanto apenas 16 foram acumuladas (Figura 6.a). Essas proteínas alteradas em resposta específica a Vibrio foram classificadas em categorias funcionais com base no "*Database of Clusters of Orthologous Genes* – *COGs*" e os COGs mais frequentes (%) dentre elas são mostrados na Figura 6.b, como segue: T – Mecanismos de transdução de sinal (13%); O - Modificação póstraducional, "*turnover*" de proteínas e chaperonas (12%); S - Função desconhecida (10%); U - Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (9%); A - processamento e modificação de RNA (6%); Z - Citoesqueleto (6%); K - Transcrição

(6%); J - Tradução, estrutura e biogênese ribossômica (5%); e demais categorias (33%). As 16 proteínas acumuladas não se encaixaram em nenhuma categoria funcional COG. Portanto, as proteínas significativamente diferentes em resposta específica a Vibrio, de todas as categorias COG descritas acima, foram reguladas negativamente.



Figura 6. a) Número de proteínas reguladas negativamente (327) e acumuladas (16) no mexilhão *Perna perna*, dentre as 343 proteínas significativamente diferentes entre *Vibrio parahaemolyticus* (VP) e todas as demais condições (CN - controle não injetado; CI - controle injetado; EC - *Escherichia coli*; e SE - *Salmonella enterica*). **b)** Frequência (%) das categorias funcionais das proteínas alteradas após o desafio com VP, que são significativamente diferentes de todas as outras condições, com base no "*Database of Clusters of Orthologous Genes – COGs*". T - Mecanismos de transdução de sinal; O - Modificação pós-traducional, "*turnover*" de proteínas e chaperonas; S - Função desconhecida; U - Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; A - processamento e modificação de RNA; Z - Citoesqueleto; K - Transcrição. Como as 16 proteínas acumuladas não se encaixaram em nenhuma categoria funcional COG, as proteínas significativamente diferentes em resposta específica a VP em todas as categorias funcionais mostradas no gráfico, foram reguladas negativamente.

A Figura 7 compara a porcentagem (%) de proteínas, para cada um dos oito COGs mais frequentes, entre proteínas significativamente diferentes (reguladas negativamente) apenas para mexilhões desafiados por V. parahaemolyticus (VP) e o total de proteínas encontradas no mexilhão P. perna (todas as outras condições). Na resposta específica a Vibrio, ou seja, proteínas significativamente diferentes de todas as outras condições, houve menor percentual de proteínas enguadradas nas categorias citoesqueleto (Z) e função desconhecida (S) em relação ao total de proteínas encontradas (Figura 7). Por outro lado, a porcentagem de proteínas incluídas nas categorias transcrição (K), processamento e modificação de RNA (A) e modificação pós-traducional, "turnover" de proteínas e chaperonas (O), foi ligeiramente maior quando comparada ao total de proteínas encontradas em P. perna (Figura 7). Embora as categorias funcionais tradução, estrutura e biogênese ribossômica (J), mecanismos de transdução de sinal (T) e tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (U) estiveram entre os principais grupos de proteínas significativamente diferentes em resposta específica a Vibrio, a porcentagem de proteínas enguadradas nessas categorias não se alterou quantitativamente em relação ao total de proteínas encontradas (Figura 7).



Figura 7. Comparação da porcentagem (%) de proteínas encontradas em todos os grupos (proteínas totais identificadas no mexilhão *Perna perna*) e proteínas alteradas em resposta específica a *Vibrio parahaemolyticus* (VP; significativamente

diferentes de todos os outros grupos), de acordo com as oito categorias funcionais (COG) mais frequentes.

5. DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE DESAFIO BACTERIANO "*in vivo*" PARA ANÁLISE HEMOCITÁRIA

Os hemócitos de *Perna perna* responderam diferencialmente de acordo com as bactérias testadas (*Escherichia coli* - EC; *Salmonella enterica* - SE; e *Vibrio parahaemolitycus* - VP). De forma geral, os mexilhões desafiados com VP – bactéria nativa do ambiente marinho - apresentaram resposta funcional e morfológica mais acentuada em comparação aos injetados com as outras bactérias - introduzidas no ambiente marinho. Especificamente em relação aos parâmetros densidade e fagocitose, foi observado o seguinte padrão: VP e EC > SE e CI > CN. Isto é, os mexilhões desafiados com VP e EC apresentaram densidade e fagocitose dos hemócitos significativamente mais elevada em comparação aos grupos desafiado com SE e controle injetado (CI), que por sua vez, superaram o controle não-injetado (CN).

A principal defesa contra patógenos é a fagocitose, que ocorre de forma coordenada a resposta humoral (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Entretanto, o primeiro passo para desencadear gualquer resposta imune é o reconhecimento do corpo estranho (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). A partir daí, ocorre a sinalização e consequente movimentação de hemócitos e de outros componentes humorais para o local em questão (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). O reconhecimento ocorre a partir dos chamados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), famílias evolutivamente conservadas de moléculas que podem ser extracelulares, ligadas à membrana ou citosólicas (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Os PRRs detectam substâncias ou estruturas bacterianas específicas, também conhecidas como PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Após a ligação dos PRRs aos seus respectivos PAMPs, são iniciadas cascatas de reações de sinalização para desencadear a resposta imune (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Com isso, a densidade de hemócitos circulantes e a fagocitose aumentam substancialmente, como resultado da movimentação dos hemócitos até o local de infecção (CANESI *et al.,* 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Para exercer suas funções citotóxicas, os hemócitos necessitam de um contato próximo com a célula-alvo (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). A adesão bacteriana à membrana do hemócito pode ocorrer tanto a partir de forças físicas - hidrofobicidade e interações de carga - quanto mediada por moléculas (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Estas podem ser receptores celulares, que reconhecem adesinas correspondentes nas superfícies microbianas, ou podem ser opsoninas, que revestem o microrganismo possibilitando a interação com receptores do hemócito e promovendo a ligação (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Após o reconhecimento do antígeno e sua adesão à membrana do hemócito, ocorre a fagocitose (CANESI *et al.,* 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). A partir de uma invaginação na membrana do hemócito no local de adesão do antígeno, a bactéria é internalizada numa vesícula denominada fagossoma primário (CANESI *et al.,* 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). A partir daí, grânulos lisossômicos se movem em direção ao fagossoma e fundem-se a sua membrana para formar o fagossoma secundário. Aqui, as enzimas lisossômicas são liberadas, iniciando a digestão e morte intracelular das bactérias (CANESI *et al.,* 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Todas as etapas de defesa supracitadas dependem das interações entre moléculas da superfície bacteriana e componentes da hemolinfa e dos hemócitos (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Sendo assim, as bactéria-hospedeiro especificidades nas interacões е а consequente suscetibilidade bacteriana variam de acordo com a cepa e com a espécie do bivalve (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Essas interações moleculares determinam a eficiência de reconhecimento das estruturas bacterianas, a aptidão dos hemócitos em se ligar e englobar a célula bacteriana, a sensibilidade bacteriana destruição intracelular fagolisossoma а possibilidade а no е de evasão/estabelecimento da bactéria nas diferentes etapas da reação imune (CANESI et al., 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

ALLAM et al. (2006) testaram o efeito da bactéria Vibrio tapetis, agente etiológico da "brown ring disease - BRD" em quatro espécies de bivalves com

diferentes susceptibilidades a doença: *Ruditapes philippinarum* (altamente susceptível), *R. decussatus* (levemente suscetível), *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* (não suscetíceis). Foi observado que o desafio com *V. tapetis* elevou significativamente a contagem total de hemócitos (THC) em apenas 2 espécies, incluindo *R. philippinarum* (ALLAM *et al.,* 2006). Nesta mesma espécie de bivalve, a porcentagem de hemócitos mortos (PHM), proteínas totais e atividade da lisozima também se elevaram significativamente após 3 dias da injeção com a bactéria (ALLAM *et al.,* 2006).

Por outro lado, após o desafio com outra espécie de *Vibrio* (*V. anguillarum*) e com uma cepa não-Vibrionaceae, *R. philippinarum* apresentou apenas elevação da contagem total de hemócitos (THC) e nenhuma resposta, respectivamente (ALLAM *et al.,* 2006). Sabe-se que *V. tapetis* possui fatores citotóxicos termossensíveis que podem ser letais para os hemócitos de *R. philippinarum* e afetam em menor grau os de *M. mercenaria* e *C. virginica* (ALLAM *et al.,* 2006). Portanto, a elevação de vários parâmetros imunológicos em *R. philippinarum* especificamente em resposta a *V. tapetis*, sobretudo THC e PHM, confirma a toxicidade da bactéria aos hemócitos do bivalve. Em contrapartida, a manutenção dos parâmetros hemocitários das outras espécies de bivalve desafiadas com *V. tapetis* demonstram "facilidade" em lidar com a bactéria (ALLAM *et al.,* 2006). Assim, fica claro como interações moleculares específicas entre cepa e bivalve conduzem à eliminação ou infecção pelo patógeno.

Da mesma forma, BALBI *et al.* (2013) investigaram os efeitos de *Vibrio esplêndido* LGP32 (V.s.) e *Vibrio aestuarianus* 01/032 (V.a.) sobre os hemócitos do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*. Ambas as cepas são patogênicas para bivalves e foram isoladas de surtos de mortalidade de ostras (BALBI *et al.*, 2013). *In vitro*, tanto V.a. quanto V.s. foram rapidamente internalizadas pelos hemócitos e induziram uma liberação de lisozima (BALBI *et al.*, 2013). Entretanto, apenas V.s. se mostrou altamente citotóxica e com potencial infeccioso. A cepa induziu uma diminuição dramática na estabilidade da membrana lisossomal (LMS) e levou a danos celulares e lisossômicos nos hemócitos, sendo capaz de sobreviver dentro deles (BALBI *et al.*, 2013). No teste *in vivo*, V.a. foi eficientemente eliminado da hemolinfa, enquanto V.s. mostrou um crescimento significativo. Este crescimento foi máximo 24h pós-injeção, correspondendo ao registro dos valores mais baixos de LMS nos hemócitos (BALBI *et al.*, 2013).

De fato, algumas bactérias produzem substâncias altamente tóxicas para os hemócitos ou que inativam determinadas frentes de defesa (por exemplo, enzimas, espécies reativas de oxigênio, dentre outros) (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Outras bactérias, por sua vez, conseguem sobreviver por mais tempo no interior dos hemócitos. Tal competência pode ser resultado de uma resistência a atividade hidrolítica dos lisossomos dos hemócitos pelos mecanismos supracitados ou por características morfológicas da bactéria (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Os componentes da superfície bacteriana (por exemplo, cápsula) podem comprometer o reconhecimento, opsonização ou proteger a bactéria contra atividades hidrolíticas dos lisossomos dos hemócitos (CANESI *et al.*, 2001; CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Qualquer combinação dos fatores acima pode influenciar a suscetibilidade de uma bactéria aos hemócitos. CANESI et al. (2001) avaliaram o papel das fímbrias tipo 1 nas interações entre *E. coli* e os hemócitos de *Mytilus galloprovincialis* Lam. Para isso, utilizaram uma cepa fimbriada (MG155) e uma cepa mutante não fimbriada (AAEC072). A cepa fimbriada apresentou maior adesão e associação com os hemócitos do que a não fimbriada (CANESI *et al.*, 2001). MG155 também foi 1,5 - 1,7 vezes mais sensível à morte pelos hemócitos do que AAEC072 (CANESI *et al.*, 2001). Em experimentos *in vivo*, as células MG155 foram eliminadas da hemolinfa circulante mais rapidamente do que as células AAEC072 (CANESI *et al.*, 2001). Presumivelmente, tais diferenças foram devido às características morfológicas das cepas, onde a presença da fimbria confere propriedades adesivas e favorece o contato com os hemócitos (CANESI *et al.*, 2001). Esses resultados confirmam a influência das propriedades de superfície na persistência e sobrevivência bacteriana no organismo do hospedeiro (CANESI *et al.*, 2001; CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

No presente estudo, VP e EC provocaram uma resposta imune celular mais acentuada em *P. perna*, quando comparadas a SE. O gênero *Vibrio* é abundante no ecossistema marinho e compreende várias espécies patogênicas para os bivalves (GOSLING, 2015). Desta forma, para prosperar nesse ambiente, os bivalves ao longo de sua história evolutiva provavelmente foram reunindo inúmeros receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) para identificar padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs) pertencentes ao gênero (GOSLING, 2015; LIU *et al.,* 2019). Uma vez que, qualquer resposta imune

depende de um reconhecimento eficaz, VP aparentemente foi facilmente reconhecida e desencadeou uma resposta celular rápida e aguda. Isso fica evidente principalmente levando em consideração a densidade, fagocitose e tamanho relativo dos hemócitos.

Em P. perna, a elevação dos parâmetros hemocitários frente ao desafio com VP também pode indicar certa dificuldade dos hemócitos em lidar com a bactéria. De fato, além de desencadear essa reposta hemocitária após 4 h da injeção, VP também provocou uma alta resposta supressora após 24h. No experimento já publicado e discutido no tópico 5.2 dessa tese (SILVA DOS SANTOS et al., 2023), foram avaliadas as respostas proteômicas de P. perna desafiado com essas mesmas bactérias (E. coli - EC, S. enterica - SE e V. parahaemolyticus - VP). Após 24h do desafio bacteriano, os mexilhões apresentaram 343 proteínas alteradas especificamente em resposta a VP, dentre as quais 326 proteínas foram reguladas negativamente (tópico 5.2; SILVA DOS SANTOS et al., 2023). Uma vez que essas proteínas foram direta ou indiretamente relacionadas à defesa, provavelmente VP é virulenta para o mexilhão P. perna e suprime proteínas-chave relacionadas à resposta imune (tópico 5.2; SILVA DOS SANTOS et al., 2023). Em contrapartida, as respostas a EC e a SE foram substancialmente inferiores. Isto é, neste dois grupos-desafio foram encontradas 2 e 16 proteínas alteradas em comparação aos controles (CN e CI), respectivamente (tópico 5.2; SILVA DOS SANTOS et al., 2023).

Apesar de não ser nativa do ambiente marinho, *E. coli* também é uma bactéria reconhecida pelo mexilhão. A bactéria é liberada em grande quantidade junto aos efluentes urbanos, que chegam à costa muitas vezes sem tratamento. SILVA DOS SANTOS *et al.* (2018) mostrou que, mesmo na Praia Vermelha - PV, considerada área de referência em função do baixíssimo nível de contaminação e local de coleta neste estudo (tópico 3.2), foram encontrados coliformes na hemolinfa de *P. perna* (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018). Além disso, foi observada uma tendência de estimulação do sistema imunológico do mexilhão em função do aumento da carga de bactérias fecais na hemolinfa, que por sua vez, reflete a contaminação da água. Tal estimulação imunológica ocorreu principalmente em relação aos parâmetros densidade de hemócitos circulantes e atividade fagocitária (SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Vários estudos já mostraram que os bivalves apresentem uma espécie de "memória imunológica", denominada de "*imunopriming*". Isto é, observa-se uma resposta diferente, geralmente mais acentuada, numa exposição secundária a cepas bacterianas semelhantes (CIACCI *et al.*, 2009; SOUSA E HINZMANN, 2020). Assim, ocorre uma ação mais rápida e eficaz como consequência da estimulação anterior, onde certas funções permanecem intensificadas por um determinado período de tempo (CIACCI *et al.*, 2009; SOUSA E HINZMANN, 2020). Com isso, por outro lado, o "*priming*" imunológico pode não ser necessariamente específico, uma vez que respostas mais genéricas podem ficar reguladas positivamente por algum tempo, agindo sobre qualquer antígeno (CIACCI *et al.*, 2009; SOUSA E HINZMANN, 2020).

Levando em consideração o "*primming*" imunológico, supõe-se que as cepas EC e VP são facilmente reconhecidas no organismo de *P. perna*, permitindo uma resposta imune mais rápida e aguda. Como já mencionado, a primeira resposta se dá a partir dos hemócitos, o que corrobora com a elevação significativa da densidade de hemócitos circulantes e da fagocitose após 4h do desafio com essas duas cepas. Entretanto, VP parece ser nocivo para *P. perna* e persistir no organismo do bivalve, uma vez que foi observado um grande número de proteínas reguladas negativamente ainda após 24h da injeção (tópico 5.2; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2023). Por outro lado, EC parece ser eliminada já na resposta imune celular inicial, uma vez que foram observadas pouquíssimas bactérias viáveis na hemolinfa do mexilhão após as 4 h do desafio bacteriano (Tabela 2; Figura 4) e apenas duas proteínas alteradas após 24h (tópico 5.2; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2023).

De forma geral, SE provocou uma resposta significativamente menor em *P. perna*, quando comparada às cepas VP e EC. *Salmonella* spp. ocorrem em uma densidade muito menor nos efluentes em comparação a *E. coli* (MADIGAN *et al.,* 2010). Assim, mesmo em locais contaminados, essa bactéria é encontrada em densidades baixíssimas. Diante do exposto, dificilmente os mexilhões coletados na PV foram expostos a *S. enterica* anteriormente ao estudo. Além disso, SE é uma bactéria parasita intracelular facultativa (JANTSCH *et al.,* 2011; KEHL *et al.,* 2020). Essa característica pode consistir em um mecanismo de evasão da bactéria, impedindo seu reconhecimento e consequente reação imune (JANTSCH *et al.,* 2011; KEHL *et al.,* 2020). Esses fatores podem explicar a baixa resposta imune e

a sobrevivência da bactéria na hemolinfa do mexilhão por mais tempo que EC. Isto é, a abundância de cepas viáveis de SE remanescentes na hemolinfa do mexilhão *P. perna* após 4 h do desafio bacteriano foi bem maior que de EC. No entanto, assim como EC, a cepa parece não ser virulenta para o mexilhão, visto que após 24h do desafio bacteriano a resposta proteômica a SE foi igualmente baixa – 16 proteínas alteradas (tópico 5.2; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2023).

A produção de ROS dos hemócitos dos mexilhões do grupo controle injetado (CI) foi maior que todos os outros grupos - controle não-injetado e injetados com bactérias. As bactérias podem evitar a morte via hemócitos, impedindo a explosão oxidativa associada à fagocitose (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Entretanto, como já mencionado, a capacidade de gerar intermediários reativos de oxigênio em resposta a estímulos apropriados varia consideravelmente dependendo das interações bivalve-parasita (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Diante disso, um dos mecanismos de evasão bacteriana para evitar ou reduzir os danos das ROS, é lançar mão de moléculas antioxidantes (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020). Alguns exemplos dessas moléculas são as enzimas superóxido dismutase (SODs), catalase, peroxidases, glutationa transferases, dentre outras (CANESI *et al.*, 2002; SOUSA E HINZMANN, 2020).

BRAMBLE E ANDERSON (1998) observaram que a atividade antioxidante da enzima catalase produzida pela bactéria *V. anguillarum* suprimiu a geração de ROS pelos hemócitos de *Crassostrea virginica*. Por outro lado, algumas cepas bacterianas podem adotar estratégias opostas. LABREUCHE *et al.*, (2006a) mostrou que *V. aestuarianus* estimula a produção de ROS e regulação negativa da expressão de superóxido dismutase de *Crassostrea gigas*. Como resultado, houve intenso estresse oxidativo e consequentes danos celulares e teciduais no hospedeiro. As três bactérias aqui testadas (EC, SE e VP) são catalase positivas e parecem adotar a primeira estratégia como mecanismo evasivo. Assim, no controle injetado, o estresse da própria injeção elevou a produção de ROS. Já nos mexilhões desafiados com as bactérias a produção de ROS foi suprimida, provavelmente pela produção de catalase.

5.2 ENSAIO DE DESAFIO BACTERIANO "*in vivo*" PARA ANÁLISE PROTEÔMICA

5.2.1 Escherichia coli

Nos mexilhões desafiados com E. coli, apenas duas proteínas foram reguladas negativamente em relação aos controles, a saber: uma proteína contendo o domínio "von Willebrand Factor A" (vWA) e uma proteína contendo o domínio FERM ("four-point-one, ezrin, radixin, moesin"). De acordo com WHITTAKER E HYNES (2002), as proteínas mais antigas contendo o domínio vWA estabeleceram-se no ambiente intracelular de todos os eucariotos e participam da transcrição, reparo do DNA, proteassoma e transporte ribossômico e de membrana. Provavelmente, os domínios vWA medeiam interações proteína-proteína de complexos multiproteicos envolvidos nessas funções. Posteriormente na evolução, os domínios vWA surgiram em proteínas extracelulares de metazoários. Dentre estas, as mais representativas na matriz extracelular são as subunidades β das integrinas, principais receptores da superfície celular e também envolvidos na adesão celular (WHITTAKER E HYNES, 2002). Por fim, nematoides e cordados diversificaram separadamente as proteínas contendo o domínio vWA da matriz extracelular. Estas atualmente compõem a maioria das proteínas conhecidas que contêm esse domínio (WHITTAKER E HYNES, 2002).

Em geral, os domínios vWA estão envolvidos em interações proteína-proteína, frequentemente usando cátions divalentes como Ca⁺² (BOWDEN *et al.*, 2020; WHITTAKER E HYNES, 2002). Alguns estudos em moluscos mostraram o importante papel do domínio vWA na defesa e na imunidade. SMITH *et al.*, (2017) encontraram proteínas do tipo matrilina, ricas no domínio vWA, no muco do gastrópode *Arion subfuscus*. Essas proteínas em conjunto com domínios lectina e C1q parecem ter um papel defensivo no muco da lesma, uma das primeiras barreiras contra patógenos. BOWDEN *et al.* (2020) observaram regulação póstraducional de vias relevantes para imunidade e metabolismo, via desiminação (desiminação ou citrulinação é uma modificação póstraducional, que corresponde à conversão do aminoácido arginina no aminoácido citrulina) de várias proteínas encontradas na hemolinfa da ostra *Crassostrea virginica*, incluindo uma proteína contendo domínio vWA.

A segunda proteína regulada negativamente em mexilhões *P. perna* injetados com *E. coli*, em comparação com os controles, foi uma proteína contendo o domínio FERM. Uma proteína com este domínio também foi encontrada na análise do transcriptoma do gastrópode marinho *Concholepas concholepas* (CÁRDENAS *et al.*, 2011). A superfamília de proteínas que possuem o domínio FERM é ubíqua e realiza a ligação entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina, por vezes mediando a ativação de seus ligantes (FRAME *et al.*, 2010; TANENTZAPF E BROWN, 2006; TEPASS, 2009). O domínio FERM pode interagir com lipídios de membrana e vários ligantes de proteínas, incluindo canais iônicos transmembrana, moléculas de adesão (por exemplo, integrinas) e proteínas citoplasmáticas. Portanto, essas proteínas atuam na estrutura, transporte e transdução de sinal das células (FRAME *et al.*, 2010; TANENTZAPF E BROWN, 2006; TEPASS, 2009).

A Figura 8 resume graficamente o papel imune-relacionado dessas duas proteínas reguladas negativamente após o desafio com *E. coli*, em uma célula hepatopancreática ciliada de mexilhão *P. perna*. A proteína contendo o domínio *"von Willebrand Factor A"* (vWA) parece se comportar como um efetor humoral em moluscos, principalmente na matriz extracelular. A proteína contendo o domínio FERM (FERM), por sua vez, provavelmente está localizada próxima à membrana plasmática e envolvida na transdução de sinal, atuando, portanto, nas fases iniciais para desencadear alguma resposta imune após o reconhecimento do patógeno.



Figura 8. Papel imune-relacionado das proteínas alteradas em uma célula ciliada do hepatopâncreas do mexilhão *Perna perna*, 24h após a injeção com *Escherichia coli*. As etapas primordiais para iniciar uma reação imune contra patógenos, de acordo com o compartimento celular, são apresentadas como: reconhecimento e sinalização (periferia celular); transdução de sinal (citoplasma); e transcrição e processamento de mRNA (núcleo). Em mexilhões desafiados com *E. coli*, uma proteína contendo o domínio von Willebrand Fator A (vWA) e uma proteína contendo o domínio FERM (FERM) foram reguladas negativamente. A proteína FERM provavelmente está localizada próximo à membrana plasmática e participa da transdução de sinal, enquanto vWA parece atuar como um efetor humoral em moluscos, principalmente na matriz extracelular.

5.2.2 Salmonella enterica

Os mexilhões desafiados com *S. enterica* apresentaram 16 proteínas diferentes significativamente - acumuladas ou reguladas negativamente - em comparação aos controles. A proteína LRGUK apresenta dois domínios essenciais para a resposta imune humoral em bivalves – os domínios de repetição rica em leucina (LRR) e guanilato quinase (GK). O primeiro caracteriza um receptor "*toll-like*" (TLR), ou seja, um receptor de reconhecimento padrão ligado à membrana

(PRR) (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). Esses receptores são cruciais para detectar inúmeras classes de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em superfícies microbianas (por exemplo: LPS, componentes da parede celular bacteriana, flagelina, dentre outros) e, portanto, desencadear a resposta imune (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). De acordo com GERDOL E VENIER (2015), os TLRs consistem em uma estrutura evolutivamente conservada, a saber: um domínio intracelular receptor *toll*-interleucina-1; uma região transmembrana; e uma região extracelular variável com um domínio LRR. No caso da LRGUK acumulada no hepatopâncreas de *P. perna*, o domínio intracelular parece ser uma guanilato quinase (GK).

As guanilato guinases associadas à membrana ("Membrane-associated guanylate kinases" - MAGUKs) são uma família de proteínas conservadas envolvidas com o desenvolvimento de tecidos, comunicação célula-célula, adesão celular e transdução de sinal (OLSEN E BREDT, 2003; ZHU et al., 2012, 2021). Originalmente, as GKs contêm um sítio de ligação GMP, que catalisa a conversão GMP para GDP. No entanto, vários estudos mostraram que as MAGUKS evoluíram, agindo atualmente na interação proteína-proteína (OLSEN E BREDT, 2003; ZHU et al., 2012, 2021). Deste modo, a proteína LRGUK encontrada neste estudo parece conter um domínio LRR para reconhecimento de patógenos e um domínio GK que realiza transdução de sinal (por exemplo, interagindo com proteínas associadas a microtúbulos; REESE et al., 2007). Da mesma forma, HUANG et al. (2018) encontraram um novo LRR transmembrana (proteína contendo os domínios de repetição rica em leucina e fibronectina tipo III) na ostra do Pacífico Crassostrea gigas. Observou-se que a proteína atua como um receptor de reconhecimento padrão para Vibrio spp. e promove a fagocitose pelos hemócitos. Além disso, foi encontrado amplamente expresso em vários tecidos, como brânquias, músculos adutores, glândulas digestivas e hemócitos (HUANG et al., 2018).

A proteína quinase ativada por estresse JNK participa da cascata da proteína quinase ativada por mitogênio ("*Mitogen-activated protein kinase*" - MAPK) (HATANAKA *et al.*, 2009; IRAZOQUI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2016). A cascata MAPK é uma via de sinalização associada à imunidade inata, conservada evolutivamente de invertebrados a mamíferos (HATANAKA *et al.*, 2009; IRAZOQUI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2009; IRAZOQUI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2009; IRAZOQUI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2016). Excluindo variações, em invertebrados a via consiste em três categorias de proteínas quinases que são fosforiladas sequencialmente e,

assim, ativam as seguintes (HATANAKA *et al.*, 2009). Em *Drosophila* e mamíferos, as proteínas quinases JNK ou p38 fosforilam fatores de transcrição no final da cascata, regulando a atividade transcricional de genes de resposta do hospedeiro (HATANAKA *et al.*, 2009). Na vieira *Patinopecten yessoensis*, apenas a quinase JNK participa da resposta imune contra bactérias Gram-negativas e -positivas (SUN *et al.*, 2016). Dessa forma, após o reconhecimento do patógeno pelos TLRs, a cascata é desencadeada e resulta na transcrição de genes de resposta do hospedeiro, que codificam proteínas relacionadas à resposta imune inata (por exemplo, peptídeos antimicrobianos) (HATANAKA *et al.*, 2009; IRAZOQUI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2016).

Após o reconhecimento e sinalização, ocorre a transcrição dos genes de resposta e o processamento do mRNA no núcleo. O complexo do fator de "splicing" da proteína 3A (SF3A) realiza o "splicing" do mRNA via spliceossomo e é composto por três proteínas, a saber: SF3A1, SF3A2 e SF3A3 (DE ARRAS E ALPER, 2013). Assim, diferentes mRNAs são construídos a partir do "splicing" do pré-mRNA, dependendo das demandas celulares. No entanto, todas as três subunidades de SF3A (SF3A1, SF3A2 e SF3A3) são necessárias para o "splicing" (DE ARRAS E ALPER, 2013). Neste estudo, a subunidade SF3A1 foi regulada negativamente após a injeção de S. enterica, sugerindo uma diminuição do "splicing" através do SF3A para construir um mRNA alternativo. De fato, DE ARRAS E ALPER (2013) observaram que o complexo SF3A agiu como um regulador da resposta imune inata em macrófagos de camundongos. Assim, se o "splicing" por SF3A ocorrer ou não, dois mRNAs alternativos são criados e conduzem a respostas imune opostas (DE ARRAS E ALPER, 2013). O mRNA processado segue para tradução por ribossomos no citoplasma. Neste estudo, a proteína ribossômica 60S L18a (RPL18A) foi acumulada em resposta ao desafio com S. enterica. RPL18A é um constituinte estrutural dos ribossomos e sua regulação positiva sugere um aumento na tradução de proteínas (AOYAMA et al., 1989).

O ativador de proteassoma PA28γ (PA28γ ou PSME3) também foi regulado positivamente em *P. perna* em resposta ao desafio com *S. enterica*. Os proteassomas são complexos de proteases em forma de barril que realizam a maioria dos processos proteolíticos em células eucarióticas (FORT *et al.*, 2015; RECHSTEINER E HILL, 2005). Portanto, os proteassomas estão envolvidos em inúmeras funções celulares básicas, como controle de qualidade de proteínas e

regulação celular (FORT *et al.*, 2015; RECHSTEINER E HILL, 2005). No entanto, a ligação de ativadores de proteassoma (PAs) é necessária para tornar os proteassomas enzimaticamente ativos. O ativador de proteassoma PA28 apresenta três homólogos, a saber: PA28 α , PA28 β e PA28 γ (FORT *et al.*, 2015; RECHSTEINER E HILL, 2005). Os dois primeiros são restritos a vertebrados mandibulados e estão relacionados a importantes funções imunológicas. Por outro lado, o PA28 γ é encontrado a partir dos primeiros invertebrados e provavelmente está envolvido na transcrição ou apoptose, uma vez que ocorre no núcleo (FORT *et al.*, 2015; RECHSTEINER E HILL, 2005).

Outra proteína regulada positivamente em mexilhões *P. perna* foi a MTFP1, que atua como um receptor para mediar a fissão mitocondrial em leveduras e células de mamíferos (SHERIDAN E MARTIN, 2010; VAN DER BLIEK *et al.*, 2013). Em células saudáveis, as mitocôndrias se fundem/dividem continuamente e se movem através do citoesqueleto em resposta a processos celulares e para manter o equilíbrio da rede mitocondrial (SHERIDAN E MARTIN, 2010; VAN DER BLIEK *et al.*, 2013). No entanto, de acordo com VAN DER BLIEK *et al.* (2013), a fusão diminui e/ou a fissão aumenta sob estresse celular. Além disso, a fissão aumenta consideravelmente durante a apoptose (SHERIDAN E MARTIN, 2010; VAN DER BLIEK *et al.*, 2013). Portanto, a proteína MPFP1 regulada positivamente no hepatopâncreas de *P. perna* sugere fissão mitocondrial aumentada e, possivelmente, apoptose. De fato, *S. enterica* é um patógeno intracelular facultativo que pode sobreviver e proliferar no ambiente intracelular (JANTSCH *et al.*, 2011; KEHL *et al.*, 2020). A apoptose pode fazer parte da defesa das células do mexilhão contra *S. enterica*, para remover células danificadas e infectadas.

Várias proteínas relacionadas à estrutura do citoesqueleto e à motilidade celular responderam significativamente à injeção de Salmonella. ACTB_G1 foi regulado negativamente, enquanto β-tubulina, dineínas axonemais (DNAH3 e DNAH9), EFHC1 e proteína 299 associada a cílios e flagelos foram regulados positivamente no hepatopâncreas de *P. perna,* em comparação com os controles. Os monômeros de actina (ACTB_G1) polimerizam em filamentos de actina que, por sua vez, se dispõem em feixes ou redes na borda da célula (FLETCHER E MULLINS, 2010; RAMAEKERS E BOSMAN, 2004). Os filamentos de actina geralmente estão associados às proteínas da membrana celular e são continuamente polimerizados e despolimerizados em resposta à sinalização local

(FLETCHER E MULLINS, 2010; RAMAEKERS E BOSMAN, 2004). Como resultado, a actina é responsável pelo movimento e forma das células (por exemplo, pseudópodes e fagocitose), além da comunicação célula-célula (FLETCHER E MULLINS, 2010; RAMAEKERS E BOSMAN, 2004). Os heterodímeros de β - e α -tubulina compõem microtúbulos que lidam com a ancoragem e o transporte de vesículas e organelas (FLETCHER E MULLINS, 2010; RAMAEKERS E BOSMAN, 2004). 2004).

Os microtúbulos, juntamente com as dineínas axonemais, também constituem cílios e flagelos (MIRVIS et al., 2018; SMITH et al., 2020). As dineínas são motores associados aos microtúbulos que hidrolisam o ATP para mediar o movimento dos cílios e flagelos (MIRVIS et al., 2018; SMITH et al., 2020). EFHC1 é uma proteína associada a microtúbulos em humanos, conservada em células que possuem cílios e/ou flagelos. A proteína contém um motivo "EF-hand" no terminal-C que se liga ao Ca⁺² (IKEDA et al., 2005; MURAI et al., 2008; ROSSETTO et al., 2011). Proteínas associadas a cílios e flagelos atuam na montagem de complexos proteicos, como o axonema (FENG et al., 2022). De fato, os túbulos hepatopancreáticos dos bivalves compreendem dois tipos de células, a saber: células digestivas acidófilas de formato cilíndrico e células basófilas de formato piramidal (TUNALI E ERKAN, 2008; YANG et al., 2021). Na maioria das espécies de bivalves, as células basofílicas possuem cílios em suas superfícies apicais e são especializadas na secreção de proteínas (TUNALI E ERKAN, 2008; YANG et al., 2021). De acordo com MIRVIS et al. (2018) e SMITH et al., (2020), a actina pode promover o desarranjo dos cílios. Portanto, o padrão proteico acima onde a actina foi regulada negativamente e todas as outras proteínas ciliares acumuladas sugere um aumento da atividade dos cílios, provavelmente relacionado ao papel secretor dessas células.

As enzimas GALK2, GPD2 e OGDHL atuam na produção de energia e no metabolismo (NELSON E COX, 2017). GALK2 converte D-galactose em α -D-galactose-1-fosfato, a primeira reação para formar glicose-6-fosfato a partir da galactose (NELSON E COX, 2017). Posteriormente, a glicose-6-fosfato pode prosseguir para as vias de glicólise ou glicogênese (NELSON E COX, 2017). GPD2 catalisa a oxidação do glicerol-3-fosfato em dihidroxiacetona fosfato, um intermediário na via glicolítica (NELSON E COX, 2017). Vale ressaltar que o glicerol é um constituinte lipídico, convertido em glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol

quinase, para ser metabolizado na glicólise (NELSON E COX, 2017). Além disso, o GPD2 participa indiretamente da cadeia respiratória (NELSON E COX, 2017). Por fim, OGDHL converte 2-oxoglutarato em S-succinil dihidrolipoamida no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (NELSON E COX, 2017). A enzima é determinante no fluxo metabólico do ciclo do TCA, uma vez que o 2-oxoglutarato é um intermediário chave no metabolismo de carbono nesse ciclo e também atua como o principal esqueleto de carbono para reações de assimilação de nitrogênio (HUERGO E DIXON, 2015; NELSON E KOX, 2017). Portanto, a enzima flutua dependendo da disponibilidade de carbono e nitrogênio e da demanda de energia (HUERGO E DIXON, 2015; NELSON E COX, 2017).

O cenário supracitado sugere alto consumo de energia e regulação do metabolismo como resultado do desafio de S. enterica. De fato, as respostas imune-celulares e -moleculares demandam um alto custo energético (BROKORDT et al., 2019). De acordo com SOKOLOVA et al. (2012), o balanço energético é crucial para os invertebrados aquáticos lidarem com o estresse. Durante estresse moderado, a demanda de energia para cobrir proteção e reparação de danos aumenta (SOKOLOVA et al., 2012). GALK2 regulado negativamente e GPD2 regulado positivamente no hepatopâncreas de P. perna sugerem uma mudança do metabolismo de carboidratos para o lipídico, juntamente com OGDHL regulado positivamente para manter o fluxo elevado no ciclo do TCA e consequente produção de energia. Da mesma forma, um declínio significativo nas reservas de glicogênio foi observado no hepatopâncreas da vieira Chlamys farreri, 3 h após o desafio com Vibrio anguillarum (WANG et al., 2012). Esses resultados mostram a preferência dos bivalves em utilizar as reservas de carboidratos como fonte de energia rápida para a resposta imune. Em circunstâncias normais e estresse moderado, o metabolismo aeróbico é suficiente para cobrir a demanda de energia e é alimentado principalmente por carboidratos e lipídios (SOKOLOVA et al., 2012). As proteínas são metabolizadas apenas durante a deficiência energética extrema (SOKOLOVA et al., 2012).

Uma visão geral das proteínas alteradas - reguladas negativamente ou positivamente - no hepatopâncreas do mexilhão *P. perna* em resposta à injeção de *S. enterica* é mostrada na Figura 9. Primeiramente, a proteína contendo os domínios de repetição rico em leucina (LRR) e guanilato quinase (GK) (LRGUK) atua no reconhecimento de patógenos - através do domínio LRR que caracteriza

um receptor "toll-like" (TLR) ligado à membrana - e na transdução de sinal - pelo domínio GK. Conforme discutido anteriormente (mexilhões injetados com E. coli), a proteína contendo o domínio FERM (FERM) possivelmente participa da transdução de sinal próximo à membrana plasmática. No final da cascata da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), a proteína guinase ativada por estresse JNK (JNK) fosforila fatores de transcrição que, por sua vez, regulam a transcrição de genes de resposta. O ativador de proteassoma PA28y (PA28y) localizado no núcleo está presumivelmente envolvido na transcrição ou apoptose. Após a transcrição, a proteína fator de "splicing" 3A subunidade 1 (SF3A1) participa do processamento do mRNA, que é traduzido no citoplasma por ribossomos constituídos pela proteína ribossomal 60S L18a (RPL18A). A proteína 1 do processo de fissão mitocondrial (MTFP1) medeia a fissão mitocondrial, processo que aumenta sob estresse celular e durante a apoptose. As proteínas actina beta/gama 1 (ACTB G1), tubulina de cadeia beta (β-tubulina), dineínas axonemais (DNAH3 e DNAH9), EFHC1 e proteína 299 associada a cílios e flagelos (CF-299) constituem o citoesqueleto e a estrutura dos cílios, que provavelmente estão relacionados com a função de secreção de proteínas das células basofílicas ciliadas do hepatopâncreas. Por fim, as enzimas GALK2, GPD2 e OGDHL (não mostradas na Figura 9) atuam na produção de energia e metabolismo, sugerindo um alto consumo de energia e regulação do metabolismo para lidar com o desafio de S. enterica.



Figura 9. Papel imune-relacionado das proteínas alteradas – acumuladas ou reguladas negativamente - em uma célula ciliada do hepatopâncreas do mexilhão Perna perna, 24 h após a injecão com Salmonella enterica. As etapas primordiais para o início de uma reação imune contra patógenos, de acordo com o compartimento celular, são apresentadas como: reconhecimento e sinalização (periferia celular); transdução de sinal (citoplasma); e transcrição e processamento de mRNA (núcleo). Primeiramente, o domínio de repetição rico em leucina (LRR) e o domínio guanilato quinase (GK) da proteína LRGUK atuam, respectivamente, no reconhecimento de patógenos e na transdução de sinal. Como nos mexilhões injetados com E. coli, a proteína contendo o domínio FERM (FERM) provavelmente também está envolvida na transdução de sinal próximo à membrana plasmática. Posteriormente, a proteína quinase ativada por estresse JNK (JNK) participa do final da cascata da proteína guinase ativada por mitogênio (MAPK), fosforilando fatores de transcrição que regulam a expressão de genes de resposta. O ativador de proteassoma PA28y (PA28y), localizado no núcleo, presumivelmente está envolvido na transcrição ou apoptose. Após a transcrição, a subunidade 1 do fator de "splicing" 3A (SF3A1) participa do processamento do mRNA, que é traduzido no citoplasma por ribossomos constituídos pela proteína ribossomal 60S L18a (RPL18A). A proteína 1 do processo de fissão mitocondrial (MTFP1) medeia a fissão mitocondrial, cuja taxa aumenta sob estresse celular e durante a apoptose.

Por fim, as proteínas actina beta/gama 1 (ACTB_G1), tubulina de cadeia beta (β-Tubulina), dineínas axonemais (DNAH3 e DNAH9), EFHC1, proteína 299 associada a cílios e flagelos (CF-299) fazem parte do citoesqueleto e estrutura dos cílios, que provavelmente estão relacionados à função de secreção de proteínas das células basofílicas ciliadas do hepatopâncreas.

5.2.3 Vibrio parahaemolyticus

Os mexilhões injetados com V. parahaemolyticus apresentaram um total de 19 significativamente diferentes - acumuladas ou proteínas reguladas negativamente – em comparação aos grupos controle. Uma romboide-protease (RHBDL1_2_3) foi regulada negativamente no hepatopâncreas de P. perna em resposta ao desafio com Vibrio. As romboide proteases compõem uma subfamília de enzimas que catalisam a proteólise intramembrana (URBAN E DICKEY, 2011). Essas serino-endopeptidases são encontradas em todos os domínios da vida e, em animais, atuam iniciando a sinalização celular (URBAN E DICKEY, 2011). Por exemplo, em Drosophila melanogaster e Caenorhabditis elegans, as romboide proteases medeiam a ativação da sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para desencadear várias vias relacionadas aos processos de desenvolvimento (DUTT et al., 2004; VAN BUSKIRK E STERNBERG, 2007; WASSERMAN et al., 2000; YOGEV et al., 2008).

Uma das principais vias ativadas pelo EGFR é a cascata MAPK (GUICHARD et al., 2000; MOGHAL E STERNBERG, 2003), discutida na seção anterior. A via MAPK regula a atividade transcricional da célula, incluindo a relacionada às respostas imunes (HATANAKA et al., 2009). Portanto, as romboide proteases podem ter algum papel na transdução de sinal envolvida na defesa contra bactérias em *P. perna*, provavelmente após o reconhecimento e sinalização através da proteína contendo os domínios de repetição rico em leucina e guanilato quinase (LRGUK; discutido na seção anterior).

Outra proteína regulada positivamente em mexilhões desafiados com Vibrio foi o fator nuclear do hepatócito-4α (HNF4α ou NR2A1). O NR2A1 faz parte de uma superfamília de fatores de transcrição chamados de receptores nucleares (NRs) (MIGLIOLI *et al.*, 2021; SLADEK, 2011). Por meio de dois domínios altamente conservados – domínios de ligação ao DNA (DBD) e de ligação ao ligante (LBD) -
os NRs regulam a transcrição em resposta a pequenos ligantes lipofílicos (MIGLIOLI *et al.*, 2021; SLADEK, 2011). Portanto, o NR2A1 controla várias funções hepáticas a nível transcricional (JIANG *et al.*, 2021). Em mamíferos, o NR2A1 regula vários genes relacionados à diferenciação de hepatócitos e ao controle de lipídios, lipoproteínas e metabolismo da glicose, dentre outras funções (JIANG *et al.*, 2021).

Em *Drosophila*, STORELLI *et al.* (2019) mostraram que NR2A1 é um regulador crucial do metabolismo lipídico no início da fase adulta. O HNF4a impulsiona a produção de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) e hidrocarbonetos derivados de VLCFA, a partir de reservas lipídicas (STORELLI *et al.*, 2019). No entanto, esses lipídios não são destinados à produção de energia, mas são secretados e transportados para as superfícies corporais para atuar como agentes impermeabilizantes e feromônios (STORELLI *et al.*, 2019). Através desse processo, o HNF4 também mantém a homeostase da glicose (STORELLI *et al.*, 2019). Um processo semelhante também ocorre em camundongos, em que o HNF4a dos hepatócitos atua na expressão de elongases de ácidos graxos, que contribuem para a impermeabilização da epiderme (STORELLI *et al.*, 2019). Portanto, NR2A1 acumulado no hepatopâncreas de *P. perna* indica a regulação de genes hepáticos provavelmente relacionados ao metabolismo lipídico. Entretanto, este pode não estar necessariamente ligado à produção de energia, mas sim a algum outro processo para lidar com o desafio bacteriano.

Após a transcrição, o mRNA é processado para formar complexos ribonucleoproteico-mensageiros (mRNPs) para serem traduzidos no citoplasma (KEW *et al.*, 2020; LI E GUAN, 2021; REN *et al.*, 2015). O "*splicing*" é uma etapa essencial no processamento do mRNA, pelo qual as sequências codificadoras de proteínas (éxons) são unidas após a remoção das sequências não codificantes (íntrons), a partir dos transcritos primários (KEW *et al.*, 2020; LI E GUAN, 2021; REN *et al.*, 2015). Assim, diferentes combinações de éxons são possíveis para formar mRNAs alternativos, o que permite expandir a gama de proteínas codificadas a partir da mesma sequência primária (KEW *et al.*, 2020; LI E GUAN, 2021; REN *et al.*, 2015). O "*splicing*" é catalisado por uma família de proteínas especializadas denominadas fatores de "*splicing*", incluindo o fator de ligação poli-U de 60 kDa (PUF60). O PUF60 parece ter um papel direto na modulação da imunidade inata (KEW *et al.*, 2020; LI E GUAN, 2021; REN *et al.*, 2015). Ao ser

desafiado com lipopolissacarídeos (LPS; constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas considerado um PAMP), o pepino do mar *Stichopus monotuberculatus* apresentou regulação positiva do mRNA de PUF60 (REN *et al.*, 2015). Vale ressaltar que a superexpressão de PUF60 pode induzir apoptose no pepino do mar (REN *et al.*, 2015).

No linguado japonês Paralichthys olivaceus, a expressão do gene PUF60 foi regulada positivamente após a infecção bacteriana e, ao contrário, foi regulada negativamente após infecção viral (LI E GUAN, 2021). Além disso, após o "knockdown" de PUF60, a disseminação bacteriana nos tecidos do linguado aumentou, enquanto que a replicação viral foi bloqueada (LI E GUAN, 2021). Na situação oposta, a superexpressão de PUF60 inibiu a disseminação bacteriana, mas promoveu a replicação viral (LI E GUAN, 2021). Semelhante ao pepino do mar, PUF60 esteve envolvido nos processos de autofagia e apoptose no linguado japonês (LI E GUAN, 2021; REN et al., 2015). Em C. elegans, a infecção bacteriana induz uma remodelação de "splicing" dependente de PUF60 (KEW et al., 2020). KEW et al. (2020) mostraram que PUF60 eleva a sensibilidade à infecção bacteriana, mas, por outro lado, aumenta a expectativa de vida provavelmente por limitar o processo inflamatório induzido pela infecção. Portanto, o aumento de PUF60 em P. perna desafiado por Vibrio corrobora com os resultados acima mencionados e sugere seu papel na modulação da imunidade em resposta à infecção bacteriana.

Ainda sobre o processamento do mRNA, a proteína THOC1 faz parte do complexo multisubunidade THO que, por sua vez, compõe o complexo de transcrição e exportação (TREX) (JIMENO E AGUILERA, 2010; REED, 2003). O complexo TREX é encontrado em todos os eucariotos e também participa do processamento do mRNA para ser transportado do núcleo para o citoplasma como complexos ribonucleoproteico-mensageiros (mRNPs) (JIMENO E AGUILERA, 2010; REED, 2003). Especificamente, o complexo THO participa tanto da transcrição quanto da exportação, pois tem um papel funcional relacionado à transcrição da RNA polimerase II (RNAPII) e medeia a exportação de mRNA (CASTELLANO-POZO *et al.*, 2012; JIMENO *et al.*, 2002; REHWINKEL *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que o complexo THO tem um papel fundamental no ciclo e diferenciação celulares (CASTELLANO-POZO *et al.*, 2012). Portanto, THOC1 (homólogo Hpr1 em *Drosophila, C. elegans* e levedura) regulado

positivamente em *P. perna*, juntamente com outras proteínas, sugere um aumento na atividade de transcrição e tradução de proteínas na célula em resposta a um sinal. De fato, o grupo de mexilhões desafiados com *Vibrio* teve a resposta mais acentuada, com aproximadamente 500 proteínas significativamente diferentes. Assim, parece que THOC1 e, portanto, o complexo THO, têm algum papel na transcrição e tradução de proteínas relacionadas à resposta imune no mexilhão *P. perna*.

Duas proteínas relacionadas à biogênese ribossomal foram alteradas em resposta ao desafio com Vibrio - RCL1 regulada negativamente e NUG1 regulada positivamente. Os transcritos primários de rRNAs que formam as subunidades ribossômicas pequenas e grandes são co-transcritos como uma única fita, para serem clivados posteriormente (HORN et al., 2011; ZHU et al., 2021). A RCL1 é uma endonuclease evolutivamente conservada que medeia essa clivagem (HORN et al., 2011; ZHU et al., 2021). Em leveduras, RCL1 cliva o pré-rRNA no sítio A2 (HORN et al., 2011), enguanto que no peixe-zebra a enzima cliva no sítio A1 (ZHU et al., 2021). Portanto, a depleção em RCL1 prejudica a maturação do ribossomo (HORN et al., 2011; ZHU et al., 2021). A nível fenotípico no peixe-zebra, os mutantes rcl1-/- exibiram alterações na organogênese digestiva, como fígado diminuto (ZHU et al., 2021). De acordo com ZHU et al. (2021), a deficiência de possivelmente desencadeia um mecanismo comum que RCL1 regula positivamente a expressão de outros genes relacionados à biogênese ribossomal. De fato, concomitante à regulação negativa de RCL1, a GTPase NUG1 (nucleostemina em humanos) foi regulada positivamente.

NUG1 é essencial para a montagem e exportação nuclear do ribossomo 60S (subunidade grande) (BASSLER *et al.*, 2006; MANIKAS *et al.*, 2016). A enzima consiste em um domínio médio GTPase flanqueado pelos domínios N- e C-terminais (BASSLER *et al.*, 2006; MANIKAS *et al.*, 2016). De acordo com BASSLER *et al.* (2006), o domínio N-terminal é crucial para o endereçamento nucleolar e associação com partículas pré-60S, uma vez que exibe atividade de ligação ao RNA. O domínio C é altamente conservado evolutivamente e também essencial para a biogênese do ribossomo, embora sua função não seja bem conhecida (BASSLER *et al.*, 2006; MANIKAS *et al.*, 2016). O domínio central GTPase é estimulado por íons de potássio e, ao contrário dos outros domínios, desempenha

um papel regulador não essencial na biogênese da subunidade pré-60 S (MANIKAS *et al.*, 2016).

MANIKAS *et al.* (2016) mostraram que NUG1 e a RNA helicase DBP10 se ligam próximo uma da outra no pré-ribossomo, onde, posteriormente, o centro peptidil-transferase (PTC) é localizado no ribossomo maduro. Portanto, propõe-se que essas enzimas estão envolvidas na formação do PTC nos ribossomos. Defeitos ou depleção de NUG1 resultam em problemas de biogênese do ribossomo 60S (MANIKAS *et al.*, 2016). Em *C. elegans*, NUG1 tem um papel no crescimento e proliferação celular, através da biogênese ribossomal (KUDRON E REINKE, 2008). Em *Drosophila*, a depleção de NUG1 prejudica as células precursoras do intestino médio e o crescimento celular, provavelmente como resultado do bloqueio da biogênese ribossomal (ROSBY *et al.*, 2009). Portanto, parece que o aumento de NUG1 no hepatopâncreas de *P. perna* provavelmente compensa a depleção de RCL1, para manter a biogênese ribossomal frente aos distúrbios causados pela injeção de Vibrio nos mexilhões.

É amplamente conhecido que as histonas são componentes estruturais da cromatina, também desempenhando papéis cruciais nos processos relacionados ao DNA (NIKAPITIYA *et al.*, 2013). No entanto, também tem sido atribuída atividade antimicrobiana às histonas ou aos peptídeos derivados de histonas, uma vez que seu N-terminal corresponde a peptídeos antimicrobianos (AMPs) (NIKAPITIYA *et al.*, 2013; VIZIOLI E SALZET, 2002). Portanto, além de sua primeira função conhecida, as histonas participam de respostas imunes inatas por meio de múltiplos mecanismos de ação, em invertebrados e vertebrados (NIKAPITIYA *et al.*, 2013; VIZIOLI E SALZET, 2002).

Histonas livres podem ser encontradas fora do núcleo (por exemplo: citoplasma, membranas e fluidos extracelulares) para facilitar a interação com patógenos (NIKAPITIYA *et al.*, 2013). Histonas ligadas a gotículas lipídicas podem ser liberadas no ambiente extracelular ou, em um processo alternativo, podem formar armadilhas extracelulares (ETS) após a morte de hemócitos, para capturar microrganismos (NIKAPITIYA *et al.*, 2013). Uma vez que as histonas também têm atividade de ligação ao LPS, elas podem estar presentes na superfície dos hemócitos agindo como PRRs (NIKAPITIYA *et al.*, 2013). Além disso, histonas e seus fragmentos, combinados com outras moléculas, podem ser liberados na hemolinfa para atuar como AMPs ou PRRs livres (NIKAPITIYA *et al.*, 2013). De

fato, a histona H2A foi demonstrada como uma precursora de peptídeos antimicrobianos em vários moluscos (DE ZOYSA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2007; SATHYAN *et al.*, 2012). Portanto, a histona H2A regulada negativamente no hepatopâncreas de *P. perna* em resposta ao Vibrio sugere que essas proteínas têm um papel em algum tipo de mecanismo antimicrobiano na defesa do mexilhão.

Uma proteína contendo o domínio transmembrana ABC Tipo 1 foi regulada positivamente no hepatopâncias de P. perna após a injeção de Vibrio. O cassete de ligação ao ATP (ABC) compreende uma superfamília de proteínas de transporte transmembrana altamente conservadas de bactérias a seres humanos (OGASAWARA et al., 2020; SHEPS et al., 2004). Essas proteínas compartilham a mesma estrutura básica - dois domínios de ligação ao ATP e dois domínios transmembrana - e apresentam alta similaridade na sequência de seu domínio de ligação ATP (OGASAWARA et al., 2020; SHEPS et al., 2004). Uma vez que são capazes de interagir com uma enorme variedade de substratos, os transportadores ABC podem apresentar diversas funções (OGASAWARA et al., 2020; SHEPS et al., 2004). Dentre os quatro tipos de proteínas ABC, o tipo 1 parece ser um dos mais antigos evolutivamente (OGASAWARA et al., 2020). As proteínas transmembrana ABC tipo 1 são especializadas na importação de nutrientes específicos (OGASAWARA et al., 2020) e seu acumulo no hepatopâncreas de P. perna sugere algum papel da importação celular frente ao desafio bacteriano.

Duas dineínas motoras de cadeia pesada também foram reguladas positivamente em mexilhões injetados com *V. parahaemolyticus*. Ao contrário das dineínas axonemais, que estão envolvidas nos batimentos dos cílios e flagelos, as dineínas citoplasmáticas são uma das três famílias de proteínas motoras do citoesqueleto (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). O domínio motor compreende seis domínios AAA organizados em um anel, que se liga ao ATP e força o movimento ao longo dos filamentos do citoesqueleto (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). O domínio de cauda, por sua vez, interage diretamente com a carga ou através do recrutamento de proteínas acessórias (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). Assim, as dineínas são capazes de se mover ao longo dos microtúbulos em transporte direcionado à extremidade (-), ou seja, se dirigindo ao centro de organização de microtúbulos próximo ao núcleo (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). As cargas da dineína incluem organelas, vesículas, fatores de transcrição, filamentos do citoesqueleto, mRNPs,

dentre outros (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). Portanto, as dineínas citoplasmáticas estão envolvidas na grande maioria dos processos celulares, incluindo a comunicação entre diferentes partes da célula ou entre células para defesa imunológica (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013).

A proteína contendo a repetição Armadillo 3 (ARMC3) foi regulada positivamente em *P. perna* desafiado com Vibrio. As proteínas contendo a repetição Armadillo (ARMCs) compõem uma família que possui um domínio caracterizado por repetições em tandem de aproximadamente 42 aminoácidos, uma estrutura que em geral permite a ligação proteína-proteína (GUL et al., 2017; HUANG et al., 2021; TEWARI et al., 2010). ARMCs também podem conter domínios adicionais no terminal -N ou -C e, portanto, apresentar funções adicionais relacionadas a esses domínios (GUL et al., 2017; HUANG et al., 2021; TEWARI et al., 2010). Esse é o caso da ARMC3, que em metazoários também apresenta um domínio adicional EDR1 (GUL et al., 2017). ARMC3 é encontrada desde os primeiros metazoários até os seres humanos, embora a similaridade entre ARMC3 de vertebrados não mamíferos e de Homo sapiens seja baixa (49%) (HUANG et al., 2021). Assim, a proteína pode apresentar diferentes funções entre esses grupos. Até onde se sabe, ARMC3 participa da cilio/flagelogênese em animais (LONERGAN et al., 2006; PAUSCH et al., 2016). Possivelmente, o acúmulo de ARMC3 em P. perna sugere um aumento na demanda da atividade ciliar nas células basofílicas do hepatopâncreas, provavelmente relacionado ao papel secretor dessas células. Além disso, o acúmulo de ARMC3 se soma ao das proteínas β -Tubulina e EFHC1, também relacionadas aos cílios e reguladas positivamente em mexilhões desafiados com Vibrio (discutido no tópico anterior).

Conforme discutido na seção anterior, as alterações associadas à defesa demandam muita energia (BROKORDT *et al.*, 2019). Como esperado, uma enzima relacionada à produção de energia e ao metabolismo foi regulada positivamente nos mexilhões desafiados com Vibrio, em comparação aos controles. A enzima mitocondrial malato desidrogenase isoforma 2 (MDH2) catalisa a conversão reversível do malato em oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico (NELSON E COX, 2017). Além disso, MDH2 participa da lançadeira malato-aspartato, que atua no tráfego de moléculas entre o citosol e as mitocôndrias, para integrar diferentes vias metabólicas (NELSON E COX, 2017). Além de participar do ciclo do ácido cítrico, o oxaloacetato é um intermediário para a gliconeogênese no citosol (NELSON E

COX, 2017). Vale ressaltar que vários aminoácidos são desaminados nas mitocôndrias para serem convertidos em oxaloacetato e, então, entrar na via da gliconeogênese (NELSON E COX, 2017). No entanto, para ser transportado pela lançadeira da mitocôndria para o citosol, o oxaloacetato precisa ser reduzido a malato pela MDH2 e, em seguida, oxidado em oxaloacetato novamente (NELSON E COX, 2017). Portanto, a regulação positiva de MDH2 sugere um aumento na demanda de energia e, possivelmente, a ativação da via de gliconeogênese.

A subunidade beta da peptidase processadora mitocondrial (PMPCB), juntamente com a subunidade alfa (PMPCA), forma as proteases processadoras mitocondriais (MPPs). Estas agem no endereçamento de proteínas do citosol para as mitocôndrias (GAKH *et al.*, 2002). Desta forma, as proteínas destinadas à matriz mitocondrial são endereçadas como precursores polipeptídicos portando prolongamentos N-terminais (GAKH *et al.*, 2002). Uma vez que essas pré-sequências alcançam sua localização final dentro da mitocôndria, esses prolongamentos são clivados pelas MPPs (GAKH *et al.*, 2002). Para isso, a PMPCA reconhece e se liga ao substrato enquanto a PMPCB é a subunidade catalítica (GAKH *et al.*, 2002). Portanto, PMPCB regulada positivamente em mexilhões desafiados com Vibrio sugere um aumento no suprimento de proteína para a mitocôndria. De fato, juntamente com a regulação positiva de MDH2, este cenário indica o aumento da atividade mitocondrial e, talvez, um aumento no suprimento de proteína para a via da gliconeogênese.

Para recapitular a discussão acima, a Figura 10 resume os papéis imunorelacionados das proteínas alteradas - reguladas negativamente ou positivamente - no mexilhão *P. perna* após o desafio com *V. parahaemolyticus*. Assim como nos mexilhões injetados com *S. enterica*, a proteína contendo o domínio de repetição rico em leucina (LRR) e guanilato quinase (GK) (LRGUK) foi regulada positivamente. Nesta proteína, o domínio LRR tipifica um receptor "*toll-like*" (TLR) para reconhecimento de patógenos e o domínio GK parece atuar na transdução de sinal. A partir daí, uma romboide-protease (RHBDL1_2_3) parece participar da transdução de sinal, desencadeando alguma via provavelmente relacionada à resposta transcricional contra patógenos. O fator de transcrição fator nuclear do hepatócito 4 α (NR2A1) regula a transcrição de genes relacionados às funções hepáticas e ao metabolismo lipídico. A proteína THOC1 também atua na transcrição e medeia a exportação de mRNA para o citoplasma. No entanto, antes da

exportação do mRNA, as proteínas fator de "splicing" 3A subunidade 1 (SF3A1) e fator de ligação poli-U 60 kDa (PUF60) participam de seu processamento. Em cooperação, as proteínas RNA 3-fosfato ciclase tipo 1 (RCL1) e a proteína nuclear de ligação ao GTP (NUG1) participam da biogênese dos ribossomos. A partir daí, o mRNA pode ser traduzido no citoplasma por ribossomos constituídos estruturalmente pela proteína ribossomal 60S L18a (RPL18A). A subunidade beta da peptidase processadora mitocondrial (PMPCB) participa do fornecimento e endereçamento de proteínas do citosol para as mitocôndrias, indicando aumento da atividade dessa organela. Corroborando com a função de PMPCB, a enzima mitocondrial malato desidrogenase isoforma 2 (MDH2) (não mostrada na Figura 10) participa do ciclo do ácido cítrico e atua no tráfego de moléculas entre o citosol e a mitocôndria. A proteína transmembrana contendo o domínio ABC tipo 1 (ABC) é especializada na importação de nutrientes específicos, presumivelmente críticos para lidar com bactérias. A histona H2A, além de sua conhecida função nuclear, pode ser encontrada fora do núcleo atuando como efetora humoral por meio de múltiplos mecanismos de ação, devido a sua atividade antimicrobiana. Por fim, as proteínas β-Tubulina, EFHC1 e ARMC3 constituem a estrutura dos cílios, e provavelmente estão relacionadas à função de secreção de proteínas das células basofílicas ciliadas do hepatopâncreas.



Figura 10. Papel imune-relacionado das proteínas alteradas – acumuladas ou reguladas negativamente - em uma célula ciliada do hepatopâncreas do mexilhão Perna perna, 24 h após a injeção com Vibrio parahaemolyticus. As etapas primordiais para o início de uma reação imune contra patógenos, de acordo com o compartimento celular, são apresentadas como: reconhecimento e sinalização (periferia celular); transdução de sinal (citoplasma); e transcrição e processamento de mRNA (núcleo). Assim como nos mexilhões injetados com S. enterica, a proteína contendo o domínio de repetição rico em leucina (LRR) e o domínio guanilato guinase (GK) (LRGUK) em seu domínio LRR tipifica um receptor "toll-like" (TLR) para reconhecimento de patógenos, já o domínio GK parece realizar a transdução de sinal. A partir daí, uma protease rombóide (RHBDL1 2 3) parece participar da transdução de sinal, desencadeando alguma via provavelmente relacionada à resposta transcricional contra patógenos. Em seguida, o fator de transcrição fator nuclear do hepatócito-4α (NR2A1) regula a transcrição de genes relacionados às funções hepáticas e ao metabolismo lipídico. THOC1 também atua na transcrição e medeia a exportação de mRNA para o citoplasma. No entanto, antes da exportação do mRNA, as proteínas fator de "splicing" 3A subunidade 1 (SF3A1) e fator de ligação poli-U 60 kDa (PUF60) participam do processamento do mRNA. Em conjunto, as proteínas RNA 3-fosfato ciclase-like 1 (RCL1) e proteína nuclear de ligação ao GTP (NUG1) são necessárias para a biogênese do ribossomo. A partir daí, o mRNA pode ser traduzido no citoplasma por ribossomos constituídos pela proteína ribossomal 60S L18a (RPL18A). A subunidade beta da peptidase de processamento mitocondrial (PMPCB) participa do fornecimento e endereçamento de proteínas do citosol para as mitocôndrias, indicando aumento da atividade dessa organela. A proteína contendo o domínio transmembrana ABC tipo 1 (ABC) é especializada na importação de nutrientes específicos, provavelmente importantes na interação com bactérias. A histona H2A, além de sua conhecida função nuclear, pode ser encontrada fora do núcleo atuando como efetor humoral por meio de múltiplos mecanismos de ação. Por fim, as proteínas β-Tubulina, EFHC1 e ARMC3 constituem a estrutura dos cílios, que provavelmente estão relacionados à função de secreção de proteínas das células basofílicas ciliadas do hepatopâncreas.

5.2.4 RESPOSTA ESPECÍFICA A Vibrio parahaemolyticus

Os mexilhões desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* (VP) apresentaram uma resposta bastante acentuada. Em um total de 597 proteínas significativamente diferentes em pelo menos uma condição, 343 proteínas foram significativamente diferentes entre VP e todas as outras condições (NC - controle não injetado; IC - controle injetado; EC - *Escherichia coli*; e SE - *Salmonella enterica*). Dessas 343 proteínas, 327 foram reguladas negativamente, enquanto apenas 16 foram reguladas positivamente (Figura 6).

Ao contrário da maioria das bactérias marinhas, o gênero Vibrio compreende várias espécies prejudiciais aos bivalves (GOSLING, 2015). De fato, as vibrioses constituem a maioria dos registros de doenças bacterianas de bivalves, muitas vezes levando à mortalidade em massa (GOSLING, 2015). Entre as aproximadamente 100 espécies do gênero, as seguintes espécies de Vibrio são associadas doencas peixes frequentemente а em е moluscos: V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. furnissii, V. campbellii, V. V. harvevi. alginolyticus e V. anguillarum (LIU et al., 2019). Estas cepas patogênicas produzem vários fatores de virulência (e.g., enterotoxinas, citotoxinas, proteases, dentre outros), que são cruciais para os seus mecanismos invasivos e subsequente infeção (LIU et al., 2019). De fato, a resposta proteômica de P. perna especificamente a V. parahaemolyticus foi mais substancial (343 proteínas alteradas) do que às bactérias introduzidas no ambiente marinho - *E. coli* e *S. enterica*.

Como os bivalves prosperaram em um ambiente rico em Vibrio ao longo de sua história evolutiva, eles provavelmente foram reunindo inúmeros receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) para identificar padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs) de espécies de Vibrio (GOSLING, 2015; LIU et al., 2019). O primeiro passo para gerar uma resposta de defesa é o reconhecimento e a transdução do sinal (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). No entanto, esta etapa pode ser prejudicada à medida que a virulência do patógeno aumenta (LIU et al., 2019; YU et al., 2019). De fato, a maioria das proteínas significativamente diferentes em P. perna em resposta específica à Vibrio correspondeu ao COG T - mecanismos de transdução de sinal. No entanto, Vibrio parece suprimir a resposta imune do *P. perna*, pois entre as 343 proteínas alteradas em resposta específica a V. parahaemolyticus, 326 proteínas foram reguladas negativamente (Figura 6). Estas proteínas foram direta ou indiretamente relacionadas à defesa, incluindo proteínas compreendidas no COG T. Assim, este resultado sugere que Vibrio é virulento para o mexilhão P. perna e provavelmente suprime proteínas-chave relacionadas à resposta imune.

Vibrio parahaemolyticus também foi considerado altamente virulento para as amêijoas Paphia undulate (YU et al., 2019). A taxa de sobrevivência das amêijoas diminuiu abruptamente em 24 h (87,2%) e 48 h (65,3%) após a infecção com V. parahaemolyticus (YU et al., 2019). Além disso, as amêijoas apresentaram uma extensa gama de genes regulados negativamente (1433), que foram associados a mecanismos celulares e moleculares para reconhecimento de patógenos e desencadeamento de resposta imune (YU et al., 2019). A amêijoa Sinonovacula constricta também apresentou uma forte resposta à infecção por V. parahaemolyticus (ZHAO et al., 2017). Após a injeção, 1.781 transcritos foram expressos de forma significativamente diferente nas brânguias e 490 no hepatopâncreas (ZHAO et al., 2017). Vários transcritos em ambos os tecidos foram especificamente relacionados à resposta imune, como receptores de reconhecimento de patógenos (PRRS) e sinalização imune e comunicação celular (ZHAO et al., 2017). Corroborando com esses resultados, estudos proteômicos com outras espécies de Vibrio (por exemplo, V. anguillarum e V. tapetis) injetadas no mexilhão Mytilus galloprovincialis e na amêijoa Ruditapes philippinarum também alteraram várias proteínas relacionadas ao reconhecimento e sinalização, entre outras funções imunológicas (JI *et al.*, 2013; SMITS *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2013).

Após o reconhecimento e sinalização, a resposta a nível subcelular envolve a transcrição de genes de resposta e processamento de RNA, incluindo "splicing" para obtenção de mRNAs alternativos (GERDOL E VENIER, 2015; HATANAKA et al., 2009; IRAZOQUI et al., 2010; SOUSA E HINZMANN, 2020). Em seguida, ocorre a tradução e as modificações pós-traducionais de proteínas recém construídas, para torná-las funcionais e endereça-las (GERDOL E VENIER, 2015; HATANAKA et al., 2009; IRAZOQUI et al., 2010; SOUSA E HINZMANN, 2020). Essas moléculas recém-formadas, por sua vez, desempenham papéis diferentes em vários níveis para desencadear respostas imune celulares e humorais, incluindo uma enorme gama de fatores de reconhecimento e efetores humorais (GERDOL E VENIER, 2015; SOUSA E HINZMANN, 2020). As principais categorias funcionais de proteínas significativamente diferentes (reguladas negativamente) em resposta específica a Vibrio corresponderam aos processos acima e reforcam a virulência de Vibrio a P. perna, a saber: O - Modificação pós-traducional, "turnover" de proteínas e chaperonas (12%); A - processamento e modificação do RNA (6%); K - Transcrição (6%); J - Tradução, estrutura e biogênese ribossômica (5%) (Figura 6.b).

Por fim, as categorias funcionais citoesqueleto (*Z*) e tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (U) tiveram um percentual aumentado de proteínas reguladas negativamente na resposta específica de *P. perna* a Vibrio (Figura 6.b). O citoesqueleto é a base de todos os movimentos celulares e trabalha em conjunto com proteínas transportadoras, para mover organelas, moléculas e vesículas (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). Consequentemente, o citoesqueleto está intimamente ligado à secreção (KARDON E VALE, 2009; ROBERTS *et al.*, 2013). Conforme discutido nos tópicos anteriores, o principal papel das células basofílicas ciliadas do hepatopâncreas é a secreção de proteínas (TUNALI E ERKAN, 2008; YANG *et al.*, 2021). Diante de um desafio bacteriano, as células basofílicas provavelmente secretam proteínas e outras moléculas relacionadas à defesa do mexilhão, como os efetores humorais observados em outros bivalves infectados com Vibrio (JI *et al.*, 2013; SMITS *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2016). Desta forma, a alta porcentagem de proteínas reguladas negativamente nas células do hepatopâncreas de *P. perna*, que estão envolvidas

na transcrição, processamento de RNA, tradução e produção de proteínas, citoesqueleto e secreção, reforça novamente a hipótese de que *V. parahaemolyticus* é virulento ao mexilhão e prejudica vários processos cruciais para desencadear a resposta de defesa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Foram observadas respostas distintas para a bactéria nativa do ecossistema marinho – *V. parahaemolyticus* – e para as bactérias introduzidas através da ação antrópica – *E. coli* e *S. enterica.* De forma geral, os mexilhões desafiados com VP apresentaram resposta celular e proteica mais acentuada em comparação aos injetados com as outras bactérias – EC e SE. Os parâmetros hemocitários, sobretudo densidade e fagocitose, se mostraram elevados após 4 h do desafio bacteriano com VP. Assim, entende-se que há um rápido reconhecimento e determinado esforço para eliminar a bactéria. No entanto, após 24h do desafio com VP, a bactéria parece se estabelecer e suprimir a resposta imune do mexilhão, com grande número de proteínas direta ou indiretamente relacionadas a imunidade sendo reguladas negativamente (327).

Os mexilhões desafiados com *E. coli* também apresentaram parâmetros celulares elevados após 4h de exposição. No entanto, foram recuperadas pouquíssimas bactérias viáveis da hemolinfa nesse mesmo período, sugerindo rápido reconhecimento e eliminação da bactéria já na resposta celular inicial. Corroborando com esse resultado, a resposta proteica após 24h do desafio com EC foi baixíssima, com apenas duas proteínas reguladas negativamente. Em contrapartida, os mexilhões desafiados com SE apresentaram baixa resposta hemocitária, semelhante ao controle-injetado (CI). Além disso, após as 4h do desafio, foi observado um número relativamente alto de bactérias viáveis. Este cenário pode ser resultado de mecanismos evasivos da bactéria, que é parasita intracelular facultativa. Assim, seu reconhecimento e consequente eliminação são dificultados. No entanto, após 24h do desafio, o sistema imune do mexilhão parece responder e ter controle sobre a bactéria, apresentando 16 proteínas significativamente diferentes dos controles, com papel relacionado ao

reconhecimento, sinalização e até apoptose, que parece ser uma resposta específica a essa bactéria parasita intracelular. Desta forma, a princípio, o mexilhão parece lidar e eliminar facilmente as bactérias introduzidas no ambiente marinho – e patogênicas para o homem – de forma oposta ao que acontece com VP que é virulenta para o bivalve.

Como já citado, os parâmetros hemocitários densidade e fagocitose foram determinantes no combate às bactérias. Além disso, apesar das respostas distintas supracitadas, as três bactérias aqui testadas (EC, SE e VP) parecem adotar o mesmo mecanismo evasivo especificamente em resposta ao estresse oxidativo associado à fagocitose. Isto é, as três bactérias são catalase positivas e possivelmente produzem esta enzima para suprimir a produção de ROS dos hemócitos. Nesse sentido, esses três parâmetros celulares respondem de acordo com determinados padrões de reconhecimento e, por sua vez, podem ser utilizados como marcadores da resposta celular.

Em relação a resposta molecular, pela primeira vez, foi possível observar um perfil global de proteínas do hepatopâncreas de *P. perna* (um total de 3.805), com foco em proteínas críticas para a relação mexilhão-bactéria. Em geral, ou seja, para as três bactérias de desafio, proteínas significativamente diferentes - reguladas negativamente ou acumuladas - desempenharam papéis críticos na resposta imune do mexilhão, como segue: reconhecimento e transdução de sinal; transcrição; processamento de RNA; tradução e processamento de proteínas; secreção; e efetores humorais contra bactérias.

6.2 PERSPECTIVAS

Este é o primeiro estudo a avaliar respostas do mexilhão *Perna perna* a nível proteico e celular, comparando as bactérias *Escherichia coli* - EC, *Salmonella enterica* – SE e *Vibrio parahaemolyticus* - VP. Assim, foi possível compreender melhor como o mexilhão interage com bactérias patogênicas para o ser humano, que são introduzidas no ecossistema marinho e, inevitavelmente, filtradas por eles. Os resultados do presente estudo trazem informações importantes sobre especificidades da interação hemócito-bactéria, que são inéditas no que diz respeito às cepas bacterianas e espécie de bivalve testados. Além disso, pela

primeira vez, foi possível observar um perfil global de proteínas do hepatopâncreas de Perna perna (um total de 3.805), com foco em proteínas críticas para a relação mexilhão-bactéria. Por se tratar de uma espécie de interesse econômico, os dados gerados podem ser úteis na biotecnologia como biomarcadores celulares e moleculares relacionados à exposição de bactérias. Desta forma, podem ser aplicados no monitoramento ambiental e na avaliação do estado de saúde e/ou segurança alimentar de espécies comerciais. Adicionalmente, entre a enorme gama de compostos relacionados a defesa contra bactérias, podem ser encontradas moléculas bioativas de interesse humano, por exemplo, moléculas com papel antimicrobiano. Levando em consideração que o sistema imune do mexilhão P. perna consegue facilmente lidar e eliminar as bactérias introduzidas no ambiente marinho - E. coli e S. enterica, seria viável o seu manejo para biorremediação de ecossistemas aquáticos impactados com bactérias patogênicas para o ser humano. Assim, o manejo do mexilhão pode ser mais estratégico, visando sua utilização como biofiltro para reduzir a carga de bactérias locais. No entanto, mais estudos são necessários visando a aplicação efetiva do bivalve e seus processos na gestão de recursos marinhos costeiros, como fazendas de bivalves.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abessa DMS, Zaroni LP, Sousa ECPM, Gasparro MR, Pereira CDS, Rachid BRF, Depledge M, King RS. Physiological and Cellular Responses in Two Populations of the Mussel *Perna perna* Collected at Different Sites from the Coast of São Paulo, Brazil. *Braz Arch Biol Techn*. 2005; 48(2):217-225.

Allam B, Paillard C, Auffret M, Ford SE. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20(3):384-97.

ANA - Agência Nacional de Águas. *Atlas esgotos. Despoluição de bacias hidrográficas*, 2021. Disponível em: http://atlasesgotos.ana.gov.br/ Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

Anderson, Marti J. PERMANOVA: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance. New Zealand: Department of Statistics, University of Auckland, 2005. p. 24.

Antunes F, Hinzmann M, Lopes-Lima M, Machado J, Costa PM. Association Between Environmental Microbiota and Indigenous Bacteria Found in Hemolymph, Extrapallial Fluid and Mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microb Ecol.* 2010; 60:304-309.

Aoyama Y, Chan YL, Meyuhas O, Wool IG. The primary structure of rat ribosomal protein L18a. *FEBS Lett.* 1989; 247:242–246.

Balasubramanian R, Im J, Lee JS, Jeon HJ, Mogeni OD, Kim JH, Rakotozandrindrainy R, Baker S, Marks F. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Hum Vaccin Immunother*. 2019; 15(6):1421–1426.

Balbi T, Fabbri R, Cortese K, Smerilli A, Ciacci C, Grande C, Vezzulli L, Pruzzo C, Canesi L. Interactions between *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and the bivalve pathogens *Vibrio aestuarianus* 01/032 and *Vibrio splendidus* LGP32. *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 35(6):1906-15.

Barracco MA, Medeiros ID, Moreira FM. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 1999; 9:387–404.

Barreto M, Castillo-Ruiz M, Retamal P. *Salmonella enterica*: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2016; 33(5):547-557.

Bassler J, Kallas M, Hurt E. The Nug1 GTPase reveals an N-terminal RNA-binding domain that is essential for association with 60 S pre-ribosomal particles. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:24737–24744.

Bianchi VA, Castro JM, Rocchetta I, Bieczynski F, Luquet CM. Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (*Diplodon chilensis*) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian lake. *Fish Shellfish Immunol.* 2014; 37(2):268-277.

Bianchi VA, Castro JM, Rocchetta I, Conforti V, Pascual M, Luquet CM. Modulating effects of orally supplied *Euglena gracilis* on the physiological responses of the freshwater mussel *Diplodon chilensis*, exposed to sewage water pollution in a Patagonian river (Argentina). *Fish Shellfish Immunol.* 2016; 51:17-25.

Bianchi VA, Castro JM, Rocchetta I, Nahabedian DE, Conforti V, Luquet CM. Longterm feeding with *Euglena gracilis* cells modulates immune responses, oxidative balance and metabolic condition in *Diplodon chilensis* (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) exposed to living *Escherichia coli*. *Fish Shellfish Immunol*. 2015; 42:367-378.

Bonnin-Jusserand M, Copin S, Le Bris C, Brauge T, Gay M, Brisabois A, Grard T, Midelet-Bourdin G. *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus and V. vulnificus*): review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 59(4):597-610.

Bowden TJ, Kraev I, Lange S. Extracellular vesicles and post-translational protein deimination signatures in mollusca—the blue mussel (*Mytilus edulis*), soft shell clam (*Mya arenaria*), eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and atlantic jacknife clam (*Ensis leei*). *Biology (Basel*). 2020; 9:1–38.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2):248-254.

Bramble LH, Anderson RS. A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum. Dev Comp Immunol.* 1998; 22:55–61.

Bravo MIS. Influence of salinity on the physiological conditions in mussels, *Perna perna* and *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Rev. Biol. Trop.* 2003; 51(4):153-158.

Bricker SB, Ferreira JG, Zhu C, Rose JM, Galimany E, Wikfors G, Saurel C, Miller RL, Wands J, Trowbridge P, Grizzle R, Wellman K, Rheault R, Steinberg J, Jacob A, Davenport ED, Ayvazian S, Chintala M, Tedesco MA. The role of shellfish aquaculture in reduction of eutrophication in an urban estuary. *Environ Sci Technol*. 2018; 52(1):173–183.

Brokordt K, Defranchi Y, Espósito I, Cárcamo C, Schmitt P, Mercado L, De la Fuente-Ortega E, Rivera-Ingraham GA. Reproduction immunity trade-off in a mollusk: Hemocyte energy metabolism underlies cellular and molecular immune responses. *Front. Physiol.* 2019; 10:77.

Broszeit S, Hattam C, Beaumont N. Bioremediation of waste under ocean acidification: Reviewing the role of *Mytilus edulis. Mar Pollut Bull.* 2016; 103(1-2):5-14.

Calvo-Ugarteburu G, Raemaekers S, Halling C. Rehabilitating mussel beds in Coffee Bay, South Africa: Towards fostering cooperative small-scale fisheries governance and enabling community upliftment. *Ambio* 2017; 46(2):214-226.

Campos A, Tedesco S, Vasconcelos V, Cristobal S. Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J. Proteomics* 2012; 75:4346–4359.

Canesi L, Pruzzo C, Tarsi R, Gallo G. Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* lam. leading to efficient bacterial clearance. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(1):464-8.

Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. Bacteria– hemocyte Interactions and Phagocytosis in Marine Bivalves. *Microsc Res Techniq*. 2002; 57:469–476.

Cantalapiedra CP, Hernández-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38:5825–5829.

Cárdenas L, Sánchez R, Gomez D, Fuenzalida G, Gallardo-Escárate C, Tanguy A. Transcriptome analysis in *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae): Mining and characterization of new genomic and molecular markers. *Mar. Genomics* 2011; 4:197–205.

Castellano-Pozo M, García-Muse T, Aguilera A. The *Caenorhabditis elegans* THO Complex is required for the mitotic cell cycle and development. *PLoS One* 2012; 7:e52447.

Ciacci C, Citterio B, Betti M, Canonico B, Roch P, Canesi L. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2009; 153(4):365-71.

Conway JR, Lex A, Gehlenborg N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 2017; 33:2938-2940.

Cunha RL, Nicastro KR, Costa J, McQuaid CD, Serrão EA, Zardi GI. Wider sampling reveals a non-sister relationship for geographically contiguous lineages of a marine mussel. *Ecol. Evol.* 2014; 4(11):2070–2081.

D'Mello JPF. Food safety: contaminants and toxins. Reino Unido: CABI Publishing, 2003. 452 p.

De Arras L E Alper S. Limiting of the innate immune response by SF3A-dependent control of MyD88 alternative mRNA splicing. *PLOS Genet.* 2013; 9:e1003855.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Whang I, Lee JS, Lee J. Abhisin: A potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 27:639–646.

Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Samain JF. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 2006; 254:571–582.

Delaporte M, Soudant P, Moal J, Lambert C, Quéré C, Miner P, Choquet G, Paillard C, Samain JF. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum. J. Exp. Biol.* 2003; 206:3053–3064.

Donaghy L, Bong-Kyu K, Hyun-Ki H, Heung-Sik P, Kwang-Sik C. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis. Fish Shellfish Immunol.* 2009; 27:296–301.

Donaghy L, Hyun-Ki H, Jauzein C, Kwang-Sik C. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 42:91–97.

Donaghy L, Hyun-Ki H, Lambert C, Heung-Sik P, Shim WJ, Kwang-Sik C. First characterization of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus. Fish Shellfish Immunol.* 2010; 28:87–97.

Dutt A, Canevascini S, Froehli-Hoier E, Hajnal A. EGF Signal propagation during *C. elegans* vulval development mediated by ROM-1 Rhomboid. *PLOS Biol.* 2004; 2:e334.

Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca, Governo do Estado de Santa Catarina. *Boletim Didático nº 95 - Comércio legal de moluscos bivalves*, 2013. Disponível em: https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Publicacao-Seriada/5-Publicacao-seriada-maricultura-mexilhao-processamento-transporte.pdf Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca, Governo do Estado de Santa Catarina. *Plano Estratégico para Desenvolvimento Sustentável da Maricultura Catarinense (2018-2028)*, 2018. Disponível em: https://www.agricultura.sc.gov.br/index.php/arquivos/cederural/camara-setorial-damaricultura/214-versao-consolidada-plano-estrategico-para-desenvolvimento-damaricultura-catarinense/file Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries & Aquaculture. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and Challenges*, 2014. Disponível em: http://www.fao.org/3/i3720e/i3720e.pdf Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

Feng M, Swevers L, Sun J. Hemocyte clusters defined by scRNA-Seq in *Bombyx mori*: *In silico* analysis of predicted marker genes and implications for potential functional roles. *Front. Immunol.* 2022; 13:1–25.

Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2019; 85(14):e00591-19.

Fischer R, Kessler BM. Gel-aided sample preparation (GASP) - a simplified method for gel-assisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. *Proteomics*. 2015; 15(7):1224-9.

Fletcher DA E Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nat.* 2010; 463:485–492.

Fort P, Kajava AV, Delsuc F, Coux O. Evolution of proteasome regulators in eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* 2015; 7:1363–1379.

Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain: Organizing the structure and function of FAK. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11:802–814.

Gakh O, Cavadini P, Isaya G. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2002; 1592:63–77.

Galvão P, Longo R, Torres JPM, Malm O. Estimating the potential production of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) reared in three tropical bays by different methods of condition indices. *J. Mar. Biol.* 2015; 2015:948053.

Gaylarde CC, Bellinaso ML, Manfio GP. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia cienc desenvolv*. 2005; 34:36-43.

Géba E, Rioult D, Palluel O, Dedourge-Geffard O, Betoulle S, Aubert D, Bigot-Clivot A. Resilience of *Dreissena polymorpha* in wastewater effluent: Use as a bioremediation tool? *J Environ Manage*. 2020a; 278(Pt 1):111513.

Géba E, Rousseau A, Le Guernic A, Escotte-Binet S, Favennec L, La Carbona S, Gargala G, Dubey JP, Villena I, Betoulle S, Aubert D, Bigot-Clivot A. Survival and infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* oocysts bioaccumulated by *Dreissena polymorpha. J Appl Microbiol.* 2020b; 1-12.

Gerdol M E Venier P. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 46:17–38.

Ghenem L, Elhadi N, Alzahrani F, Nishibuchi M. *Vibrio Parahaemolyticus*: A review on distribution, pathogenesis, virulence determinants and epidemiology. *Saudi J Med Med Sci.* 2017; 5(2): 93-103.

Goedken M E De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 2004; 16:539–552.

Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. Diarrheagenic *Escherichia coli. Braz J Microbiol.* 2016; 47S:3-30.

Gonzalez P E Pierron F. Omics in aquatic ecotoxicology: the ultimate response to biological questions? *Aquat. Ecotoxicol. Adv. Tools Deal. with Emerg. Risks* 2015; 2015:183–203.

Gosling, Elizabeth. Marine Bivalve Molluscs. 2. ed. Reino Unido: John Wiley & Sons Ltd., 2015. 525 p.

Guichard A, Roark M, Ronshaugen M, Bier E. Brother of rhomboid, a rhomboidrelated gene expressed during early *Drosophila* oogenesis, promotes EGF-R/MAPK signaling. *Dev. Biol.* 2000; 226:255–266.

Gul IS, Hulpiau P, Saeys Y, van Roy F. Metazoan evolution of the armadillo repeat superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017; 74:525–541.

Hatanaka R, Sekine Y, Hayakawa T, Takeda K, Ichijo H. Signaling pathways in invertebrate immune and stress response. *Invertebr. Surviv. J.* 2009; 6:32–43.

Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003; 293:249–265.

Horn DM, Mason SL, Karbstein K. Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *J. Biol. Chem.* 2011; 286:34082–34087.

Huang Q, Yu M, Chen H, Zeng M, Sun Y, Saha TT, Chen D. LRFN (leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein) recognizes bacteria and

promotes hemocytic phagocytosis in the Pacific oyster Crassostrea gigas. Fish Shellfish Immunol. 2018; 72:622–628.

Huang Y, Jiang Z, Gao X, Luo P, Jiang X. ARMC subfamily: structures, functions, evolutions, interactions, and diseases. *Front. Mol. Biosci.* 2021; 8:1–21.

Huergo LF E Dixon R. The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015; 79:419–435.

Ikeda T, Ikeda K, Enomoto M, Park MK, Hirono M, Kamiya R. The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett.* 2005; 579:819–822.

Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. Evolution of host innate defence: Insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10:47–58.

Islam MdS E Tanaka M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar Pollut Bull.* 2004; 48:624-649.

Ismail NS, Dodd H, Sassoubre LM, Horne AJ, Boehm AB, Luthy RG. Improvement of urban lake water quality by removal of *Escherichia coli* through the action of the bivalve *Anodonta californiensis*. *Environ Sci Technol*. 2015; 49(3):1664-72.

Ismail NS, Tommerdahl JP, Boehm AB, Luthy RG. *Escherichia coli* reduction by bivalves in an impaired river impacted by agricultural land use. *Environ Sci Technol*. 2016; 50(20):11025-11033.

Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol*. 2017; 123:570-581.

Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M. Cellular aspects of immunity to intracellular Salmonella enterica. Immunol. Rev. 2011; 240:185–195. Ji C, Wu H, Wei L, Zhao J, Wang Q, Lu H. Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics. *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 35:489–498.

Jiang S, Tanaka T, Yagami R, Hasegawa G, Umezu H, Fujiyoshi Y, Kodama T, Naito M, Ajioka Y. Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor-4α in vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 2021; 84:2906–2914.

Jimeno S E Aguilera A. The THO complex as a key mRNP biogenesis factor in development and cell differentiation. *J. Biol.* 2010; 9:1–3.

Jimeno S, Rondón AG, Luna R, Aguilera A. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J.* 2002; 21:3526–3535.

Kardon JR E Vale RD. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10:854–865.

Kehl A, Noster J, Hensel M. Eat in or take out? Metabolism of intracellular *Salmonella enterica*. *Trends Microbiol*. 2020; 28:644–654.

Kew C, Huang W, Fischer J, Ganesan R, Robinson N, Antebi A. Evolutionarily conserved regulation of immunity by the splicing factor RNP-6/PUF60. *Elife* 2020; 9: 1–23.

Krepsky N, Nunes KP, de Paula Junior LA, Lino VAA, Naveira e Silva CAC, Brandão IP, Silva dos Santos F. Dry sand quality: the case study of a touristic beach from Rio de Janeiro, Brazil. *Front J Soc Technol Environ Sci.* 2020; 9(1):32-52.

Kudron MM E Reinke V. *C. elegans* nucleostemin is required for larval growth and germline stem cell division. *PLOS Genet.* 2008; 4:e1000181.

Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microb. Infect.* 2006a; 8:2715–2724.

Labreuche Y, Soudant P, Gonçalves M, Lambert C, Nicolas JL. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.* 2006b; 30:367-379.

Ladhar-Chaabouni R E Hamza-Chaffai A. The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment. *Cytotechnology*. 2016; 68(5):1669–1685.

Lage H E Jablonski S. Mussel *Perna perna* extraction and commercialization in Guanabara Bay, Brazil. Atlântica. 2008; 30:161-169.

Lambert C, Soudant P, Choquet G, Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 15:225–240.

Lara G, Contreras A, Encina F. La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae) potencial biofiltro para disminuir los niveles de coliformes en pozos. Experimentos de laboratorio. *Gayana*. 2002; 66:113-8.

Lathlean JA and McQuaid CD. Biogeographic variability in the value of mussel beds as ecosystem engineers on South African rocky shores. *Ecosystems* 2017; 20:568–582.

Lex A, Gehlenborg N, Strobelt H, Vuillemot R, Pfister H. UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Trans Vis Comput Graph (InfoVis)* 2014; 20:1983-1992.

Li C, Song L, Zhao J, Zhu L, Zou H, Zhang H, Wang H, Cai Z. Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri. Fish Shellfish Immunol.* 2007; 22:663–672.

Li R, Zhang W, Lu J, Zhang Z, Mu C, Song W, Migaud H, Wang C, Bekaert M. The whole-genome sequencing and hybrid assembly of *Mytilus coruscus. Front. Genet.* 2020; 11:440.

Li W E Guan X. PUF60 of Japanese flounder is regulated by pol-miR-novel_395 and involved in pathogen infection, autophagy, and apoptosis. *Dev. Comp. Immunol.* 2021; 123:104170.

Lino AS, Galvão PMA, Longo RTL, Azevedo-Silva CE, Dorneles PR, Torres JPM, Malm O. Metal bioaccumulation in consumed marine bivalves in Southeast Brazilian coast. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2016; 34:50–55.

Liu D, Wu C, Wu R, Huang J, Liao B, Lei M, Zhang Y, He H. Comprehensive analysis of the phylogeny and extracellular proteases in genus *Vibrio* strain. *Microb. Pathog.* 2019; 131:1–8.

Lokmer A and Wegner KM. Hemolymph microbiome of pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J.* 2015; 9(3):670-682.

Lonergan KM, Chari R, DeLeeuw RJ, Shadeo A, Chi B, Tsao MS, Jones S, Marra M, Ling V, Ng R, MacAulay C, Lam S, Lam WL. Identification of novel lung genes in bronchial epithelium by serial analysis of gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35:651–661.

Longo C, Cardone F, Corriero G, Licciano M, Pierri C, Stabili L. The co-occurrence of the demosponge *Hymeniacidon perlevis* and the edible mussel *Mytilus galloprovincialis* as a new tool for bacterial load mitigation in aquaculture. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23(4):3736-46.

Lourenço CR, Nicastro KR, Serrão EA, Zardi GI. First record of the brown mussel (*Perna perna*) from the European Atlantic coast. *Mar. Biodivers. Rec.* 2012; 5:e39.

Lukwambe B, Nicholaus R, Zhao L, Yang W, Zhu J, Zheng Z. Microbial community and interspecies interaction during grazing of ark shell bivalve (*Scapharca subcrenata*) in a full-scale bioremediation system of mariculture effluents. *Mar Environ Res.* 2020; 158:104956.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p. Manikas RG, Thomson E, Thoms M, Hurt E. The K⁺-dependent GTPase Nug1 is implicated in the association of the helicase Dbp10 to the immature peptidyl transferase centre during ribosome maturation. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:1800–1812.

Mezzanotte V, Marazzi F, Bissa M, Pacchioni S, Binelli A, Parolini M, Magni S, Ruggeri FM, Morghen CG, Zanotto C, Radaelli A. Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels. *Sci Total Environ*. 2016; 539:395-400.

Miglioli A, Canesi L, Gomes IDL, Schubert M, Dumollard R. Nuclear receptors and development of marine invertebrates. *Genes (Basel)*. 2021; 12:1–21.

Milan M, Carraro L, Fariselli P, Martino ME, Cavalieri D, Vitali F, Boffo L, Patarnello T, Bargelloni L, Cardazzo B. Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. *Aquat. Toxicol.* 2018; 194:195-207.

Mirvis M, Stearns T, Nelson WJ. Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochem. J.* 2018; 475:2329–2353.

Moghal N E Sternberg PW. The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis* elegans. EGF Recept. Fam. Biol. Mech. Role Cancer 2003; 2003:157–166.

Murai MJ, Sassonia RC, Zamboni AH, Conte FF, Martins-de-Souza D, Aparicio R, de Oliveira MG, Lopes-Cendes I. Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: Dimer formation blocks Ca²⁺ and Mg²⁺ binding to its functional EF-hand. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008; 477:131–138.

Nalini S, Sandy Richard D, Mohammed Riyaz SU, Kavitha G, Inbakandan D. Antibacterial macro molecules from marine organisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 115:696–710.

Narváez M, Freites L, Guevara M, Mendoza J, Guderley H, Lodeiros CJ, Salazar G. Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2008; 149:293–302. Nelson, David L. E Cox, Michael M. Lehninger Principles of Biochemistry. 7. ed. New York: W.H. Freeman, 2017. 1308 p.

Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LAJ, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. Science 2016; 352:aaf1098.

Neves RAF, Naveira C, Miyahira IC, Portugal SGM, Krepsky N, Santos LN. Are invasive species always negative to aquatic ecosystem services? The role of dark false mussel for water quality improvement in a multi-impacted urban coastal lagoon. *Water Res.* 2020; 184:116108.

Nikapitiya C, Dorrington T, Gómez-Chiarri M. The role of histones in the immune responses of aquatic invertebrates. *Invertebr. Surviv. J.* 2013; 10:94–101.

Ogasawara F, Kodan A, Ueda K. ABC proteins in evolution. *FEBS Lett.* 2020; 594:3876–3881.

Olivier AS, Jones L, Vay LL, Christie M, Wilson J, Malham SK. A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. *Rev Aquac*. 2020; 12:3–25.

Olsen O E Bredt DS. Functional analysis of the nucleotide binding domain of membrane-associated guanylate kinases. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:6873–6878.

Parisi MG, Hui L, Jouvet LBP, Dyrynda EA, Parrinello N, Cammarata M, Roch P. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25:834-840.

Pausch H, Venhoranta H, Wurmser C, Hakala K, Iso-Touru T, Sironen A, Vingborg RK, Lohi H, Söderquist L, Fries R, Andersson M. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (*Bos taurus*) cattle. *BMC Genet.* 2016; 17:1–9.

Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(1):56-59.

Ramaekers FCS E Bosman FT. The cytoskeleton and disease. *J. Pathol.* 2004; 204:351–354.

Rebelo MF, Figueiredo ES, Mariante RM, Nóbrega A, De Barros CM, Allodi S. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLoS One* 2013; 8(2):e57384.

Rechsteiner M E Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: Cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2005; 15:27–33.

Reed R. Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003; 15:326–331.

Reese ML, Dakoji S, Bredt DS, Dötsch V. The guanylate kinase domain of the MAGUK PSD-95 binds dynamically to a conserved motif in MAP1a. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007; 14:155–163.

Rehwinkel J, Herold A, Gari K, Köcher T, Rode M, Ciccarelli FL, Wilm M, Izaurralde E. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11:558–566.

Ren C, Chen T, Sun H, Jiang X, Hu C, Qian J, Wang Y. The first echinoderm poly-U-binding factor 60 kDa (PUF60) from sea cucumber (Stichopus monotuberculatus): Molecular characterization. inducible expression and involvement of apoptosis. Fish Shellfish Immunol. 2015; 47:196-204.

Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14:713–726.

Rosa IC, Costa R, Gonçalves F, Pereira JL. Bioremediation of metal-rich effluents: could the invasive bivalve work as a biofilter? *J Environ Qual*. 2014; 43(5):1536-45.

Rosby R, Zhengfang C, Rogers E, DeLivron MA, Robinson VL, DiMario PJ. Knockdown of the *Drosophila* GTPase nucleostemin 1 impairs large ribosomal subunit biogenesis, cell growth, and midgut precursor cell maintenance. *Mol. Biol. Cell* 2009; 20:4424–4434.

Rossetto MG, Zanarella E, Orso G, Scorzeto M, Megighian A, Kumar V, Delgadoescueta AV, Daga A. Defhc1.1, a homologue of the juvenile myoclonic gene EFHC1, modulates architecture and basal activity of the neuromuscular junction in *Drosophila. Hum. Mol. Genet.* 2011; 20:4248–4257.

Sabatini SE, Rocchetta I, Luquet CM, Guido MI, Molina MCR. Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologica*. 2011; 41:356–362.

Santos AL, Medeiros JVF, Grault CE, Santos MJS, Souza ALA, Carvalho RW. The fungus *Pestalotiopsis* sp., isolated from *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae) cultured on marine farms in southeastern Brazil and destined for human consumption. *Mar. Pollut. Bull.* 2020; 153:110976.

Santos AL, Oliveira LTF, Souza ALA, Hauser-Davis RA, De Simone SG. *Cryptosporidium* spp. contamination in *Perna perna* mussels destined for human consumption in southeastern Rio de Janeiro, Brazil. *B. Environ. Contam. Tox.* 2018; 100:240–244.

Sathyan N, Philip R, Chaithanya ER, Kumar PRA. Identification and molecular characterization of Molluskin, a histone-H2A-derived antimicrobial peptide from molluscs. *ISRN Mol. Biol.* 2012; 2012:1–6.

Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Senécal L, Goudreau P, Fournier M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat Toxicol.* 2002; 58:189–200.

Shen R, Gu X, Chen H, Mao Z, Zeng Q, Jeppesen E. Combining bivalve (*Corbicula fluminea*) and filter-feeding fish (*Aristichthys nobilis*) enhances the bioremediation effect of algae: An outdoor mesocosm study. *Sci Total Environ.* 2020; 727:138692.

Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.* 2004; 5:R15.

Sheridan C E Martin SJ. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* 2010; 10:640–648.

Shuval H. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *J Water Health*. 2003; 1(2):53-64.

Silva dos Santos F, Krepsky N, Teixeira VL, Martins VB, da Silva PM, Neves RAF. Fecal pollution increases susceptibility to diseases in brown mussel *Perna perna* from cultured and wild populations. *Aquaculture* 2022a; 551:737922.

Silva dos Santos F, Neves RAF, Bernay B, Krepsky N, Teixeira VL, Artigaud S. The first use of LC-MS/MS proteomic approach in the brown mussel *Perna perna* after bacterial challenge: Searching for key proteins on immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 2023; 134:108622.

Silva dos Santos F, Neves RAF, Carvalho WFC, Krepsky N, Crapez MAC. Evaluation of the immune responses of the brown mussel *Perna perna* as indicators of fecal pollution. *Fish Shellfish Immunol.* 2018; 80:115-123.

Silva dos Santos F, Neves RAF, Crapez MAC, Teixeira VL, Krepsky N. How does the brown mussel *Perna perna* respond to environmental pollution? A review on pollution biomarkers. *J. Environ. Sci. (China)* 2022b; 111:412–428.

Silva PM, Magalhães ARM, Barraco MA. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* 2002; 79:154–162.

Silva PM, Magalhães ARM, Barraco MA. Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 2012; 92(3):571–579.

Sladek FM. What are nuclear receptor ligands? *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011; 334:3– 13.

Smith AM, Papaleo C, Reid CW, Bliss JM. RNA-Seq reveals a central role for lectin, C1q and von Willebrand Factor A domains in the defensive glue of a terrestrial slug. *Biofouling* 2017; 33:741–754. Smith CEL, Lake AVR, Johnson CA. Primary cilia, ciliogenesis and the actin cytoskeleton: a little less resorption, a little more actin please. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8:1586.

Smits M, Artigaud S, Bernay B, Pichereau V, Bargelloni L, Paillard C. A proteomic study of resistance to Brown Ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum. Fish Shellfish Immunol.* 2020; 99:641–653.

Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin AA. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 2012; 79:1–15.

Sousa H E Hinzmann M. Review: Antibacterial components of the Bivalve's immune system and the potential of freshwater bivalves as a source of new antibacterial compounds. *Fish Shellfish Immunol.* 2020; 98:971–980.

Souza RV, Campos CJA, Garbossa LHP, Seiffert WQ. Compliance of brown mussel (*Perna perna*) production areas in the South of Brazil with the bacteriological criteria of the shellfish hygiene systems in the European Union and United States of merica: assessing the impacts on consumer safety. *J. Water Health* 2017; 15(5):834-838.

Storelli G, Nam HJ, Simcox J, Villanueva CJ, Thummel CS. *Drosophila* HNF4 directs a switch in lipid metabolism that supports the transition to adulthood. *Dev. Cell* 2019; 48:200-214.e6.

Suárez-Morales E, Scardua MP, Silva PM. Occurrence and histopathological effects of *Monstrilla* sp. (Copepoda: Monstrilloida) and other parasites in the brown mussel *Perna perna* from Brazil. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 2010; 90(5):953–958.

Sun Y, Zhang L, Zhang M, Li R, Li Y, Hu X, Wang S, Bao Z. Characterization of three mitogen-activated protein kinases (MAPK) genes reveals involvement of ERK and JNK, not p38 in defense against bacterial infection in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis. Fish Shellfish Immunol.* 2016; 54:507–515.

Suplicy FM, Vianna LFN, Rupp GS, Novaes ALT, Garbossa LHP, Souza RV, Guzenski J, Costa SW, Silva FM, Santos AA. Planning and management for

sustainable coastal aquaculture development in Santa Catarina State, south Brazil. *Rev. Aquacult.* 2015; 0:1–18.

Tanentzapf G E Brown NH. An interaction between integrin and the talin FERM domain mediates integrin activation but not linkage to the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8:601–606.

Tepass U. FERM proteins in animal morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009; 19:357–367.

Tewari R, Bailes E, Bunting KA, Coates JC. Armadillo-repeat protein functions: Questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* 2010; 20:470–481.

Tunali Y E Erkan M. A structural study of functional cells in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Pak. J. Zool.* 2008; 40:109–114.

Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods.* 2016; 13:731–740.

Urban S E Dickey SW. The rhomboid protease family: A decade of progress on function and mechanism. *Genome Biol.* 2011; 12:231.

Van Buskirk C E Sternberg PW. Epidermal growth factor signaling induces behavioral quiescence in *Caenorhabditis elegans. Nat. Neurosci.* 2007; 10:1300–1307.

van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5:a011072.

Vaughn CC and Hoellein TJ. Bivalve impacts in freshwater and marine ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2018; 49:183-208.

Vizioli J E Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23:494–496.

Wang X, Wang L, Zhang H, Ji Q, Song L, Qiu L, Zhou Z, Wang M, Wang L. Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum*

challenge and high temperature exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 2012; 33:1016– 1026.

Wang ZH, Yang JQ, Zhang DJ, Zhou J, Zhang CD, Su XR, Li TW. Composition and structure of microbial communities associated with different domestic sewage outfalls. *Genet Mol Res.* 2014; 13(3):7542-7552.

Wasserman JD, Urban S, Freeman M. A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev.* 2000; 14:1651–1663.

Whittaker CA E Hynes RO. Distribution and evolution of vonWillebrand/Integrin A domains: widely dispersed domainswith roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* 2002; 13:3369.

Wu H, Ji C, Wei L, Zhao J, Lu H. Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum. J. Proteomics* 2013; 94:54–67.

Yang J, Luo J, Zheng H, Lu Y, Zhang H. Cloning of a big defensin gene and its response to *Vibrio parahaemolyticus* challenge in the noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae). *Fish Shellfish Immunol.* 2016; 56:445–449.

Yang Q, Guo K, Zhou X, Tang X, Yu X, Yao W, Wu Z. Histopathology, antioxidant responses, transcriptome and gene expression analysis in triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii* after bacterial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 2021; 124:104175.

Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol.* 2017; 199:811–825.

Yogev S, Schejter ED, Shilo BZ. *Drosophila* EGFR signalling is modulated by differential compartmentalization of Rhomboid intramembrane proteases. *EMBO J.* 2008; 27:1219–1230.

Yu M, Zheng L, Wang X, Wu M, Qi M, Fu W, Zhang Y. Comparative transcriptomic analysis of surf clams (*Paphia undulate*) infected with two strains of *Vibrio* spp. reveals the identity of key immune genes involved in host defense. *BMC Genomics* 2019; 20:1–17.

Zhao X, Duan X, Wang Z, Zhang W, Li Y, Jin C, Xiong J, Li C. Comparative transcriptome analysis of *Sinonovacula constricta* in gills and hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 67:523–535.

Zhu J, Shang Y, Chen J, Zhang M. Structure and function of the guanylate kinaselike domain of the MAGUK family scaffold proteins. *Front. Biol. (Beijing).* 2012; 7:379–396.

Zhu Q, Tao B, Chen H, Shi H, Huang L, Chen J, Hu M, Lo LJ, Peng J. Rcl1 depletion impairs 18S pre-rRNA processing at the A1-site and up-regulates a cohort of ribosome biogenesis genes in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49:5743–5759.

8. APÊNDICE 1

Artigos publicados relacionados a tese de doutorado



Review

How does the brown mussel Perna perna respond to environmental pollution? A review on pollution biomarkers

Fernanda Silva dos Santos^{1,*}, Raquel A.F. Neves², Mirian Araújo Carlos Crapez³, Valéria Laneuville Teixeira^{1,2}, Natascha Krepsky^{2,4}

^a Fluminense Federal University (UFF), Institute of Biology, Graduate Program in Science and Biotechnology, Mario Santos Braga Street, s/n. Centro, Niterói, RJ CEP 24.020-141, Brazil

 ^b Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Institute of Biosciences (IBIO), Graduate Program in Neotropical Biodiversity (PPGBIO), Pasteur Avenue, 458. Urca, Rio de Janeiro, RJ CEP 22.290-255, Brazil
³ Fluminense Federal University (UFF), Institute of Biology, Graduate Program in Marine Biology and Coastal Environments, Mario Santos Braga Street, s/n. Centro, Niterói, RJ CEP 24.020-141, Brazil
⁴ Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Institute of Biosciences (BIO), Graduate Program in Ecoto urism and Conservation, Pasteur Avenue, 458. Urca, Rio de Janeiro, RJ CEP 22.290-255, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 5 November 2020 Revised 9 April 2021 Accepted 9 April 2021

Keywords: Biological ind exes Biomonitoring Emerging pollutants Hydrocarbons Metals Sentinel species

ABSTRACT

The brown mussel Perna perna (Lin naeus, 1758) is a valuable resource for aquaculture in tropical and subtropical coastal regions. It presents desirable characteristics for biomonitoring, including being sessile, widely distributed and abundant, and is a filter-feeder able to accumulate several classes of pollutants (e.g., metals, hydrocarbons, among others). Mussels' biological responses to pollution exposure can be measured as biomarkers, which include alterations ranging from molecular to physiological levels, to estimate the degree of environmental contamination and its effects on biota. This full review compiles two decades (2000-2020) of literature concerning biological effects on P. perna mussel caused by environmental pollutants (i.e., metals, hydrocarbons, and emerging pollutants), considering environmental and farm-based biomonitoring. Biochemical markers related to mussels' oxidative status were efficient for the biomonitoring of metals (i.e., antioxidant enzymes associated with oxidative damage in biomolecules). Genotoxicity and cytotoxicity indicators (i.e., comet, micronucleus, and neutral red assays) provided a depiction of hydrocarbon contamination. The neutral red assay gave a time-concentration cytotoxic response to a wide range of pollutants, including emerging pollutants (e.g., pharmaceuticals and biocides) and hydrocarbons. Perna perna hemocyte parameters provided a useful approach for biocide biomonitoring. This paper summarizes useful biomarkers from molecular to physiological levels

* Corresponding author at: Federal University of the State of Rio de Janeiro - UNIRIO, Institute of Biosciences - IBIO, Department of Environmental Sciences, Laboratory of Water Microbiology - LACQUA, Av. Pasteur, 458, sala 310, Rio de Janeiro, RJ CEP 22290-240, Brazil. E-mails: fernandasildesan@hotmail.com (F. Silva dos Santos), gbmvalt@vm.uff.br (V.L. Teixeira).

https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.04.006

1001-0742/@ 2021 The Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Published by Elsevier B.V.
Aquaculture 551 (2022) 737922



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture



Aquacultur

Fecal pollution increases susceptibility to diseases in brown mussel *Perna perna* from cultured and wild populations

Fernanda Silva dos Santos ^{a,e,*}, Natascha Krepsky^{b,d}, Valéria Laneuville Teixeira ^{a, b}, Vinícius Barbosa Martins^c, Patricia Mirella da Silva^c, Raquel A.F. Neves^{b,e}

* Graduate Program in Sciences and Biotechnology, Institute of Biology, Ruminense Federal University (UFB), R. Mario Santos Braga, s/n. Centro, Nbrról, RJ CEP 24.020-141, Brazil

¹⁰ Graduate Program in Neotropical Biodiversity (PPGBIO), Institute of Biosciences (IBLO), Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIBIO), An. Pasteur, 458, Urca, Rio de Janeiro, RJ CEP: 22290-255, Brazil

Claboratory of Immunology and Pathology of Marine Invertebrates (LABIPI), Department of Molecular Biology, Federal University of Baralba (UFPB), CEP: 58051-900 Join Pessa, PB, Braul

⁴ Graduate Program in Economism and Conservation, Institute of Biosciences (IBRO), Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNI BRO), Av. Pasteur, 458. Urca, Rio de Janeiro, RJ CEP: 22290-255, Brazil

⁶ Research Group in Experimental and Aquatic Ecology, Institute of Biosciences (IBIO), Rederal University of the State of Bio de Janeiro (UNIBIO), An. Pasteur, 458-307, Urca, Rio de Janeiro, RJ CEP: 22290-240, Brazil

ARTICLEINFO

Keywordi: Commercial bivalve Mariculture Microbial contamination Parasitic infection Pathological conditions

ABSTRACT

Maricultural systems for food production have expanded worldwide since the 2000s, including the production of brown mussel Pema pema - a key aquaculture species in Venezuela, South Africa, and Brazil. Bivalves grown in sewage-polluted areas can act as sources for human diseases given their filter-feeding behavior. Moreover, sewage can affect mussels' microbiota and fitness, thereby making them more susceptible to infections and diseases, leading to mortalities. In the present study, we investigated the impacts of coastal fecal pollution on P. perna pathological conditions. Fecal indicator bacteria (FIB) were used to assess the microbiological quality in the seawater and mussels' hemolymph from four beaches located at Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil: Vermelha (VB), Icaraí (IB), and Urca (UB), where mussels are exploited for consumption and local market sale; and Jurujuba (JB) farming area where mussels are cultured. Additionally, mussels had their organs surveyed for pathological conditions and parasitic infection by histology. UB presented the highest FIB counts in seawater, followed by IB, JB and VB. Moreover, significantly lower values of total coliforms (TC) were found in mussels hemolymph from VB and IB than JB and UB, which are probably related to differences in the hydrodynamic of these beaches; VB and IB are open beaches, while JB and UB are sheltered. Our findings suggest that mussel's hemolymph could be used as an indicator of the water quality. Mussels from VB and IB presented lower overall incidence of pathological conditions than ones from JB and UB, suggesting that higher fecal contamination increases mussel susceptibility to pathologies. Mussels from VB were associated with an elasmobranch parasite (Tyloophalum sp.) that indicate a conservative ecological dynamic. Our findings highlight that sewage inputs into coastal systems and farming areas raises the risks of parasitosis and diseases in mussels, which may compromise the quantity and quality of shellfish production and lead to economic losses. In response, public investments in urban planning and sanitary regulation close to coastal systems and farming areas are crucial to prevent future problems for the shellfish market and human safety, especially in developing countries such as Brazil

1. Introduction

worldwide attaining expressive results especially in East Asia and Pacific (-94.6 million tons in 2018; Ritchie and Roser, 2019). The world's food production by aquaculture more than doubled over the last decades,

Since the 2000s, food production via aquaculture has expanded

* Corresponding author at: Graduate Program in Sciences and Biotechnology, Institute of Biology, Fluminense Federal University (UFF), R. Mario Santos Braga, s/n. Centro, Niterói, RJ CEP 24.020-141, Brazil.

E-mail address: semand asiklosan@hotmail.com (F. Silva dos Santos).

https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737922

Received 9 October 2021; Received in revised form 4 January 2022; Accepted 11 January 2022 Available online 15 January 2022 0044-8486/©2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Fish and Shellfish Immunology 134 (2023) 108622



Contents lists available at ScienceDirect Fish and Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Full length article

The first use of LC-MS/MS proteomic approach in the brown mussel Perna perna after bacterial challenge: Searching for key proteins on immune response

Fernanda Silva dos Santos ^{a,c,*}, Raquel A.F. Neves ^{b, c}, Benoît Bernay^e, Natascha Krepsky^b, Valéria Laneuville Teixeira^{a,b}, Sébastien Artigaud^d

⁸ Graduate Program in Sciences and Biotechnology, Institute of Biology, Ruminense Federal University (UFF), R. Mario Santos Braga, S/n. Centro, Niterió, RJ, CEP 24.020-141, Brasil

^b Graduate Program in Neotropical Biodiversity (PPGBIO), Institute of Biosciences (IBIO), Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIBIO), An. Pasteur, 458, Una, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 22290-255, Brasil ⁶ Research Group of Experimental and Aquaric Ecology, Institute of Biosciences (IBIC), Federal University of the State of Bio de Janeiro (UNIBO), An. Pasteur, 458-307, Urca, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 22290-240, Brazil

¹⁰ Université de Breix, CNRS, IRD, Weiner, UMR 65:39 LEMAR, F-29280, Plansané, France
⁶ Hateforme Proteogen, SFR ICORE 4206, Université de Caen Basse-Normandik, Esplanade de la país, 14032, Caen cedes; France

ARTICLE INFO

Keywords: Excherichia coli Hepatopancreas te-related proteins LC-MS/MS Perma perma Protein profile Salmonella enterica Shellfish Vibrio parahaemolyticas

ABSTRACT

The brown mussel Perna perna is a valuable fishing resource, primarily in tropical and subtropical coastal regions. Because of their filter-feeding habits, mussels are directly exposed to bacteria in the water column. Exclusional coli (EC) and Salmonella enterica (SE) inhabit human guts and reach the marine environment through anthropogenic sources, such as sewage. Vibrio parahaemolyticus (VP) is indigenous to coastal ecosystems but can be harmful to shell fish. In this study, we aimed to assess the protein profile of the hepatopancreas of P. perna mussel challenged by introduced - E. coll and S. enterica - and indigenous marine bacteria - V. parahaemolyticus. Bacterialchallenge groups were compared with non-injected (NC) and injected control (IC) - that consisted in mussels not challenged and mussels injected with sterile PBS-NaCl, respectively. Through LGMS/MS proteomic analysis, 3805 proteins were found in the hepatopancreas of P. perna. From the total, 597 were significantly different among conditions. Mussels injected with VP presented 343 proteins downregulated compared with all the other conditions, suggesting that VP suppresses their immune response. Particularly, 31 altered proteins - upregulated or downregulated - for one or more challenge groups (EC, SE, and VP) compared with controls (NC and IC) are discussed in detail in the paper. For the three tested bacteria, significantly different proteins were found to perform critical roles in immune response at all levels, namely: recognition and signal transduction; transcription; RNA processing; translation and protein processing; secretion; and humoral effectors. This is the first shotgun proteomic study in P. perna mussel, therefore providing an overview of the protein profile of the mussel hepatopancreas, focused on the immune response against bacteria. Hence, it is possible to understand the immune-bacteria relationship at molecular levels better. This knowledge can support the development of strategies and tools to be applied to coastal marine resource management and contribute to the sustainability of coastal systems.

1. Introduction

Coastal pollution is a concern worldwide and is often concentrated along densely-populated areas in low- and middle-income countries [1, 2]. Continental runoff and sewage introduce excessive nutrients and pathogenic bacteria in the coastal waters, therefore altering the local microbial communities and, consequently, the ecological dynamics [2-4]. Additionally, anthropogenic pollution, not to mention climate

* Corresponding author, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro Instituto de Biociências, Departamento de Ciências do Ambiente, Laboratório de Microbiologia das Águas, Av. Pasteur, 458, sala 310, Rio de Janeiro, RJ, CEP 22290-240, Brazil.

E-mail addresses: rnandasildosan@homail.com (F. Silva dos Santos), raquel.neves@unirio.br (R.A.F. Neves), benoit.bernay@unicaen.fr (B. Bernay), natascha@ unirio.hr (N. Krepsky), gbmvalt@vm.uff.br (V.L. Teixeira), sebastlen.artigaud@univ-brest.fr (S. Artigaud).

https://doi.org/10.1016/j.8i.2023.108622

Received 16 December 2022; Received in revised form 14 February 2023; Accepted 16 February 2023 Available online 17 February 2023 1050-4648/@ 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

9. APÊNDICE 2

Demais artigos publicados ao longo do doutorado

Journal of Environmental Chemical Engineering 8 (2020) 103941



What do we know about the utilization of the Sargassum species as biosorbents of trace metals in Brazil?



Amanda Cunha de Souza Coração[®], Fernanda Silva dos Santos^b, Jorge Andrés Duarte Duarte^b, Erick Alves Pereira Lopes-Filho[°], Joel Campos De-Paula[®], Leandro Machado Rocha^{®,d}, Natascha Krepsky^c, Sorele Batista Fiaux^{®,d}, Valéria Laneuville Teixeira^{®,b,b}

⁴ Universidade Federal da Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, Avenida Pateur, 458. Unco, Rio de Janeiro, RJ, CEP-22.290-255, Brasil ⁶ Universidade Federal Flomineme, Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, R. Mario Santos Brago, v.n. Centro, Niterió, RJ, CEP.

24.020-141 Brazil Universidade Pederal do Estado do Rio de Janáro, Centro de Ciência: Biológicas e do Saúde, Instituzo de Biocióncias. Programa de Pós-Graduação em Biotamento e

Construção, Avenila Pateur, 458. Urca, Bio de Janeiro, RJ, CEP.22.290-255 Brast. ⁶ Universidade Redemi Ruminense, Facildade de Familcia. Programa de Pris-Graduação em Ciências e Biotecnologia. R. Mario Viana, 523. Santa Rosa, Nierói; RJ, CEP 24.020141 Brasil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de His-Graduação em Botânica, Museu Nacional Horto Botânico – Quinta da Boa Vista. São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20940.040 Brasil

ARTICLEINFO

Editor: Despo Kassinos Reywords Alginate Wosciption Brown algae Metal Polition

ABSTRACT

In the last decades, metal pollution has become one of the most critical environmental and public health concerns. Human use and processing of trace metals have altered these metals' natural biogeochemical cycles, which is causing adverse impacts on human beings, natural comm anities, and a quatic ecosystems. In Brazil, mining and smelting are relevant metal contamination sources that affect many aquatic systems, besides agricultural residues, industrial and urban effluent discharges. In this context, seaweed biosorption is a promising technology for the removal of metals from wastewater that could prevent environmental contamination. Seaweeds show high metal sequestering capacities, cost-effectiveness, and eco-friendliness. In this review, we aimed to assess previous studies on trace metals biosorption using the brown seaweed of the genus Sargassam conducted in Brazil during the last two decades (1999-2019). An overview of metal pollution in Brazil and its possible treatments are presented. A theoretical basis regarding Sorgasaum and its mechanism of scription of trace metals is described. We also discuss previous Brazilian studies on this topic, including their aims, the trace metals analyzed, and the experimental conditions that increase biosorption effectiveness, which include oH, temperature, algae pretreatment, and immobilization of the biosorbent in a matrix. Given the abundance of this genus throughout the Brazilian coast and its high metal recovering capacity, the algae sorption process semains an underexplored resource. We conclude this work with a patent search and a discussion of the future perspectives of Sargasum use by society.

1. Introduction

I.I. Source and Biological Effects of Trace Metals Exposition

The term "trace metal" refers to any chemical element found at low concentrations (less than $100 \ \mu g \ g^{-1}$) in the environment or biological compartments [1]. Among them are the so-called heavy metals, a group that is generally considered highly toxic. Nevertheless, the scientific classification for the term "heavy metal" is very controversial and has recently been subjected to a broad discussion [2]. Therefore, the decision was made to use the more general term "trace metals" in this text. Some of these elements, including lead (Pb) and cadmium (Cd), do

not have any known biological roles and are toxic to living beings, even at small concentrations. On the other hand, many trace metals, e.g.,

Bearing contract from serviced.

https://doi.org/10.1016/j.jcc.2020.103941 Received 12 February 2000; Received in revised form 6 April 2020; Accepted 8 April 2020 Available online 14 April 2020 2213-3437; 6 2020 Elsevier Izd. All rights reserved.

^{*} Corresponding authorat: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Gências Biológicas e da Saúde, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biodíversidad e Neotropical, Avenida Pasteur, 458. Urca, Rio de Janeiro, RJ, CEP-22.290-255, Brazil.

E-mail addresses: amanda: 10 hotmail.com (A.C.d.S. Coração), fernandasildosan@hotmail.com (F.S.d. Santos), depaula.joelo@gmail.com (J.C. De Paula), genvalită va.uff.br (VL. Teixeira).

Environmental Pollution 268 (2021) 115911 Contents lists available at ScienceDirect



Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



Acute toxicity of Bisphenol A (BPA) to tropical marine and estuarine species from different trophic groups*

Clarissa Naveira ^{a, b}, Nathália Rodrigues ^{a, b}, Fernanda S. Santos ^{b, c}, Luciano N. Santos ^{a, b, d}, Raquel A.F. Neves a.b.

Graduate Program in Neotropical Biodiversity (PIGBIO), Institute of Biosciences (IBIO), Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNRRO), Avenida Pasteur, 458, Urca, Rio de Janeiro, CEP: 22.200-240, Bazil ¹⁰ Research Group of Experimental and Applied Aquatic Ecology, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Avenida Pasteur, 458 – 307, Urca,

Rio de Janeiro, CEP: 22,290-340, Brazil Graduate Program in Science and Biotechnology, Institute of Biology, Fluminense Federal University (UFF), Rua Mario Santos Braga, Sin, Centro, Niterói,

Brazil ⁴ Laboratory of Theoretical and Applied Ichthyology, Institute of Biosciences (IBIO) Federal University of the State of Bio de Janeiro (UNIBIO), Avenida Pasteur, 458, Lab. 314A, Urca, Rio de Janeiro, CEP: 22,290-240, Brazil

ARTICLEINFO

Article history: Received 30 June 2020 Received in revised form 2 October 2020 Accepted 19 October 2020 Available online 22 October 2020

Keywords Concentration-response Endocrine disrupters Lethality test LC50 Species sensitivity distribution (SSD)

ABSTRACT

BPA is chemical pollutant of very high concern due to its toxicity to the environment and risks for human health. Environmental concern consists in BPA entrance into aquatic ecosystems due to acute and chronic toxicity to invertebrates and vertebrates. This study a imed to determine acute BPA toxicity to tropical estuarine-marine species of four trophic levels and integrate BPA toxicity values using species sensitivity distribution (SSD) analysis. Our hypothesis is that BPA toxicity increases towards higher trophic levels. Microalga (Tetraselmis sp.), zooplanktonic grazer (Artemia salina), deposit-feeder invertebrate (Heleobia australis), and omnivorous fish (Poecilia vivipara) were chosen as experimental models. Tetraselmis sp. showed the highest BPA tolerance, without a concentration-dependent response. Species sensitivity have increased from A, solitor (LG₂₀₂₀₆ = 10.2 mg L⁻¹), followed by H australis (LC₂₀₂₀₆ = 11.53.5 mg L⁻¹) to P, *vivipara* (LC₅₀₂₀₆ = 3.5 mg L⁻¹). Despite the toxicity hierarchy towards trophic levels, which partially supported our hypothesis, SSD did not evidence a clear pattern among estuarine-marine trophic groups. Our study disclosed the sensitivity of not yet investigated species to BPA and, in an integrative way, highlighted BPA toxic effects at different trophic levels. Although estimated acute hazardous concentration ($\text{HC5} = 1.18 \text{ mg L}^{-1}$) for estuarine and marine species was higher than environmentally relevant concentrations, suble thal adverse effects induced by BPA exposure may lead to unbalances in population levels and consequently affect the ecological functioning of tropical coastal systems

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Credit author statement

Clarissa Naveira, Nathália Rodrigues, Fernanda S. Santos, Raquel A.F. Neves, Conceptualization. Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Methodology, Clarissa Naveira, Nathália Rodrigues, Fernanda S. Santos, Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Validation. Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Formal analysis. Clarissa Naveira,

https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115911 0269-7491/i0 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Nathália Rodrigues, Fernanda S. Santos, Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Investigation. Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Resources. Clarissa Naveira, Nathália Rodrigues, Fernanda S. Santos, Raquel A.F. Neves, Writing - original draft. Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Writing - review & editing, Clarissa Naveira, Nathália Rodrigues, Fernanda S. Santos, Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Visualization. Luciano N. Santos, Raquel A.F. Neves, Funding acquisition.

1. Introduction

Bisphenol A (BPA), 2,2-bis(4-hydroxydiphenyl) propane, is one of the most used industrial chemicals worldwide that has been



^{*} This paper has been recommended for acceptance by Sarah Harmon.

Corresponding author. RAF Neves Research Group of Experimental and Applied Aquatic Ecology, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Avenida Pasteur, 458 - 307, Urca, Rio de Janeiro, CEP: 222290-240, Brazil. E-mail address: suggetneed unirio.br (R.A.F. Neves).

Marine Pollution Bulletin 164 (2021) 112027



Baseline

Faecal bacteria density in tropical seawater: The Itanemas' cove case study, Angra dos Reis, Brazil



Natascha Krepsky^{a,b,*}, Viviane A. de A. Lino^a, Fernanda Silva dos Santos^{a,c}, Clarissa A. C. Naveira

* Department of Environmental Science, Institute of Biosciences, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Av. Pasteur, 458, CEP 22290-240 Rio de Janeira, R.J. Brazil

^b Graduate Program of Biological Science (Neoropical Biodiversity), Institute of Biosciences, Federal University of the State of Bio de Janeiro (UNBIO), Av. Pasteur, 458, CEP 22290-240 Bio de Janeiro, R.J. Brasil

⁶ Graduate Program of Sciences and Biotechnology, Institute of Biology, Ruminense Federal University (UFF), R. Mario Santos Braga, s/n. Centro, Nteról, RJ CEP 24.020-141, Brasil

ARTICLEINFO

ABSTRACT

Keyword: Ribeim Bay Tounism Conservation Eacherichia coli Pollution Branil	Angra dos Reis can receive up to 1.3 million tourists in the summer season. The lack of an adequate sanitary system makes sewage contamination a growing concern in Ribeira Bay, Angra dos Reis, Brazil. This study aims to investigate the seasonal variation of face al indicator bacteria (FBB) and abiotic variables in Itanema cove situated within Ribeira Bay. Despite the seasonal population increase (>80 individuals) and the absence of an integrated sanitary system, our results indicate that Itanema is still a stable estuarine environment. From 2017 to 2019, the mean salinity was 27.91, pH was 7.82, and water temperature was 25.01 °C. However, the FIB number was 10 ⁵ , suggesting the absence of sewage treatment in Itanema's outfall. Following current conservation status, baseline studies are mandatory for background references of endangered coastal areas such as Itanema cove. These studies are crucial for future governance decisions and sustainable tourism implementation in Angra dos Reis.

Tourism is the most influential business on the planet and fuels regional economies (Botero et al., 2017; Buer et al., 2018; Zielinski et al., 2019). Beaches are the favourite destination for more than half of all tourists (Botero et al., 2017; Zielinski et al., 2019). However, high impact tourism can negatively influence the coastal environment. leading to biodiversity loss and decreased local inhabitants' life quality (Buer et al., 2018; Franklin et al., 2018; Tyllianakis et al., 2019), Domestic sewage is the principal waste discharged continuously into the tropical marine environment (Franklin et al., 2018; Islam and Tanaka, 2004). In developing countries, organic matter-rich sewage directly enters the coastal waters resulting in bacterial decomposition and water quality decline (Franklin et al., 2018; Islam and Tanaka, 2004; Wear and Thurber, 2015). Furthermore, viral, bacterial and protozoan pathogens, aside from other harmful substances, can reach coastal waters through se wage discharges, affecting human and marine biota health (Islam a Tanaka, 2004; Wear and Thurber, 2015), Therefore, tropical authorities should be concerned with sustainable tourism development, controlling

sewage discharges, maintaining safe, healthy and esthetical beaches to please and attract the tourists, stimulating local economic growth, and the conservation of regional culture and biodiversity (Botero et al., 2017; Tyllianakis et al., 2019; Zielinski et al., 2019).

Angra dos Reis coast attracts up to 1.3 million tourists, significantly increasing its estimated population of 203,785 citizens in the summer season and holidays (Angranews, 2010; IBGE, 2019; Rodrigues et al., 2011; Silva et al., 2017). To increase tourism, the Brazilian government is in the process of passing a bill to convert protected areas, including the Tamoios Ecological Station, into a Special Area of Tourist Interest (Bolsonaro, 2019) without a sanitary network expansion plan. In 2019, septic tanks and other sanitary systems covered only 84.9% of the Angra dos Reis settlements, as its bulk population is established dispersed along the BR 101 highway (IBGE, 2019; Silva et al., 2017). Although this bill can increase tourism in Angra dos Reis and stimulate the local economy, it can also impair the marine ecosystem in Ribeira bay, Ribeira Bay hosts six protected islands of the Tamoios Ecological Station (Brazil,

https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112027

Received 30 May 2020; Received in revised form 5 January 2021; Accepted 11 January 2021 0025-326X/@ 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Department of Environmental Science, Institute of Biosciences, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Av. Pasteur, 458, CEP 22290-240 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

E-mail addresses: natascha@unirio.br (N. Krepsky), viviane.linoa@gmail.com (V.A.A. Lino), fesilidesan@gmail.com (F. Silva dos Santos), clarissa.silva@unirio.br (C.A.C. Naveira).