

Rafael Trevisan

MECANISMOS DE DEFESAS CELULARES RELACIONADOS A DEFESAS ANTIOXIDANTES E DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM MEXILHÕES *Perna perna* E OSTRAS *Crassostrea gigas* EXPOSTAS A AGENTES OXIDANTES E ELETROFÍLICOS.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Trevisan, Rafael

Mecanismos de defesas celulares relacionados a defesas antioxidantes e de biotransformação em mexilhões Perna perna e ostras Crassostrea gigas expostas a agentes oxidantes e eletrofílicos / Rafael Trevisan ; orientador, Alcir Luiz Dafre - Florianópolis, SC, 2014.
200 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Toxicologia. 3. Bivalves. 4. Estresse oxidativo. 5. Metabolismo. I. Dafre, Alcir Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Mecanismos de defesas celulares relacionados a defesas antioxidantes e de biotransformação em mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* expostas a agentes oxidantes e eletrofilicos"
por

RAFAEL TREVISAN

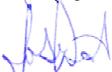
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 015/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

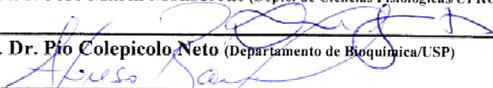


Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre (BQA/CCB/UFSC)

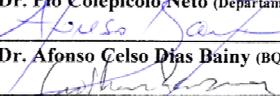
Banca examinadora:



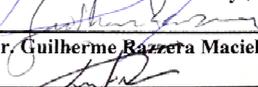
Prof. Dr. José Maria Monserrat (Depto. de Ciências Fisiológicas/UFGRS)



Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto (Departamento de Bioquímica/USP)



Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy (BQA/CCB/UFSC)

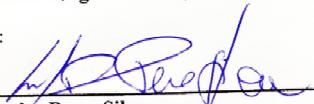


Prof. Dr. Guilherme Bazzera Maciel (BQA/CCB/UFSC)



Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa (BEG/CCB/UFSC)

Coordenador:



Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Este trabalho é dedicado à minha família e à minha noiva Danielle, pelo eterno apoio nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

O caminho traçado ao longo deste doutorado foi muito mais fácil com o apoio de diversas pessoas que participaram, direta ou indiretamente, desta jornada. Neste pequeno espaço deixo minha gratidão a todos vocês, mesmo sabendo que merecem muito mais do que apenas algumas frases e palavras.

Agradeço ao meu orientador Alcir L. Dafre, o qual se tornou um grande amigo ao longo desses 10 anos nos quais trabalhamos em conjunto. Com uma constante disposição para ajudar e orientar, apontando erros a serem corrigidos e caminhos a serem escolhidos, sou imensamente grato por guiar minha formação profissional. Por permitir minha participação na elaboração de projetos de pesquisa, incentivar a discussão de dados e construção em conjunto de experimentos, acabei tendo uma visão mais ampla e coletiva da ciência, afinal nem tudo pode ser feito sozinho. Obrigado por tudo.

Sou grato também aos meus colegas do Laboratório de Defesas Celulares Luiz, Ariana, Naíssa, Daiane, Mari, Miriam e Gabriel, os quais sempre fizeram do ambiente de trabalho um espaço mais fraterno e familiar. Isso faz muita diferença em um trabalho onde, por muitas vezes, passamos por situações de desespero ao longo da realização dos projetos. Também sempre estiveram presentes quando precisei de ajuda na bancada ou na discussão de protocolos e dados, as quais não foram poucas vezes.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPESC, assim como ao PPGBQA, por proporcionarem todos os recursos necessários para o desenvolvimento dos projetos de pesquisa e implementação de minha bolsa de doutorado. Também sou grato ao Programa Ciência sem Fronteiras, o qual custeou uma bolsa de doutorado sanduíche na Irlanda por 10 meses, permitindo o contato com um universo de pesquisa diferente. Também sou grato ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA), o qual também custeou o desenvolvimento de projetos de pesquisa relacionados à minha tese de doutorado.

Agradeço ao professor Eduardo Almeida, seus alunos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática da UNESP e ao Danilo, pelo estágio realizado em São José do Rio Preto a fim de desenvolver as análises por HPLC.

Também sou grato aos professores Afonso e Risoleta por sempre disponibilizarem a estrutura do Laboratório de Biomarcadores de

Contaminação Aquática e Imunoquímica da UFSC, assim como material de consumo.

Ao professor David Sheehan, da University College Cork – Irlanda, por ter me acolhido em seu laboratório para a realização do doutorado sanduíche e ter fornecido todo o apoio para aprender sobre o novo mundo da proteômica. Também agradeço à sua aluna de doutorado, Tahira, a qual sempre me ajudou e também se tornou uma grande amiga na Irlanda.

Aos meus amigos Chico, Lê, Sérgio, May, André, Alemão, Dí, Tonho, Liana, Mari e Solano, que muitas vezes tornaram dos fins de semana verdadeiras férias, e sempre me deram todo o apoio para terminar o doutorado, sem nunca compreender como que trabalhar com ostras e mexilhões poderia ser algo tão complicado.

À minha mãe e ao meu irmão, sou grato por fazerem de uma família tão pequena algo tão grande e especial. Por compreenderem que esse longo caminho de anos e anos de estudo foi o que eu escolhi para iniciar uma nova vida, e estiveram ao meu lado em cada um desses inúmeros dias. Também sou eternamente grato ao meu pai, e gostaria que pudesse ver que seus frutos cresceram, sempre seguindo seu caminho.

Por último, agradeço à minha companheira Danielle, com quem escolhi seguir minha vida, a qual acredito ter sido a melhor escolha que fiz até hoje. Também sou grato por toda a ajuda ao longo do doutorado, participando nas coletas, no trabalho de bancada, e também na frente do computador ou de longas discussões à respeito de ideias e dos dados do doutorado. Sua calma e compreensão nos meses antecedentes à defesa de doutorado também foram fundamentais. Saiba que você sempre faz dos meus dias algo único e especial, e me traz muita alegria quando olho para um futuro ao seu lado.

RESUMO

Com o aumento nos níveis de contaminação ambiental em nível global, organismos aquáticos estão sujeitos à ação tóxica de diversos xenobióticos, necessitando de eficientes sistemas de defesas para garantir sua sobrevivência. Neste trabalho, os bivalves *Crassostrea gigas* (ostra do Pacífico) e *Perna perna* (mexilhão marrom) foram utilizados como organismos modelo para o estudo dos sistemas de defesas antioxidantes e de biotransformação. Em um primeiro trabalho, as vias de biotransformação de fase II e do ácido mercaptúrico foram estudadas em ostras *C. gigas* expostas ao agente eletrofílico 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Os dados apontam que a brânquia possui um robusto sistema de biotransformação, atuando como importante ponto de entrada para o CDNB e conjugando-o rapidamente com glutathione. A hemolinfa atuou como um transportador de metabólitos pelo organismo, permitindo que outros tecidos auxiliassem no processo de biotransformação e excreção, enquanto que a glândula digestiva atuou como um tecido auxiliar na metabolização. O derivado final da via do ácido mercaptúrico foi detectado como principal metabólito na água do mar, comprovando sua excreção. Um segundo trabalho investigou o papel das enzimas antioxidantes glutathione redutase e tioredoxina redutase em *C. gigas* e *P. perna* expostos a agentes oxidantes (hidroperóxido de cumeno e menadiona). Através de uma exposição aguda destes organismos a $ZnCl_2$ ou CDNB, foi possível diminuir significativamente a atividade dessas enzimas, e conseqüentemente, afetando os sistemas de degradação de peróxidos dependentes das enzimas glutathione peroxidase e peroxiredoxina. Foi observada uma menor capacidade de degradação de peróxidos *in vivo* e maior mortalidade induzida por exposição ao peróxido de cumeno ou a menadiona. Estes resultados reforçam a ideia de uma maior susceptibilidade de organismos com um sistema antioxidante menos eficiente. O último estudo investigou a toxicidade de um contaminante emergente, nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP), sobre ostras *C. gigas*. Neste trabalho foi observado que as ZnONP se agregam quando em água do mar, passando da escala nanométrica para micrométrica. Além disso, foi detectada uma alta taxa de liberação de zinco iônico na água do mar. A exposição de ostras a ZnONP por até 48 h causou acúmulo de zinco inicialmente na brânquia (24 e 48 h), seguido da glândula digestiva (48 h). Análises de microscopia eletrônica sugerem a presença de vesículas endocíticas contendo ZnONP em ambos os tecidos. Análises de marcadores antioxidantes e de estresse oxidativo

apontam para um moderado efeito oxidativo das ZnONP no citosol, principalmente na brânquia após 48 h, causando peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e inibição da glutathione redutase. Porém, tanto as análises ultraestruturais quanto as bioquímicas apontam para fortes distúrbios mitocondriais, com alterações estruturais e oxidação de proteínas na brânquia e glândula digestiva. De modo geral, os estudos apontam que em bivalves: (i) ataques eletrofilicos podem ocorrer de maneira indiscriminada pelo organismo na ausência de um sistema de biotransformação íntegro na brânquia, (ii) danos oxidativos podem ser acumulados na ausência de um eficiente sistema antioxidante, afetando a sobrevivência do organismo e (iii) a mitocôndria de bivalves é susceptível a eventos oxidativos induzidos por ZnONP.

Palavras chaves: glutathione, peroxidases, thioredoxina reductase, glutathione S-transferase, nanopartículas de óxido de zinco, bivalves, via do ácido mercaptúrico.

ABSTRACT

With the increasing level of global environmental contamination, aquatic species are subjected to the effects of different xenobiotics, relying on efficient cellular defenses systems to provide their survival. In this study, bivalves *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) and *Perna perna* (brown mussel) were used as model organisms to study the antioxidant and biotransformation systems. In a first study, the phase II biotransformation and mercapturic acid pathways were investigated in oysters *C. gigas* exposed to the electrophilic agent 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Data suggest that gill hold a robust biotransformation system, acting as an important site for CDNB uptake and quickly conjugating it with glutathione. The hemolymph allowed the transport of metabolites across the organism, allowing other tissues to aid on biotransformation and excretion processes. The digestive gland participated as a metabolizing ancillary tissue. The final product, mercapturic acid, was found as main metabolite in water, confirming its excretion by the organism. A second study investigated the role of the antioxidant enzymes glutathione reductase and thioredoxin reductase in *C. gigas* and *P. perna* exposed to oxidative agents (cumene hydroperoxide and menadione). Using an acute exposure to ZnCl₂ or CDNB, enzymatic activity was considerably decreased, thus affecting the peroxide detoxification system of glutathione peroxidase and peroxiredoxin. These inhibitions jeopardized *in vivo* peroxide detoxification ability, inducing higher mortality on a further exposure to cumene hydroperoxide or menadione. These data reinforce the idea of a higher susceptibility in organisms with a less effective antioxidant system. The last study partially characterized the toxicity of an emerging contaminant, zinc oxide nanoparticles (ZnONP), to *C. gigas*. It was observed that ZnONP aggregate in seawater, changing from a nanometric to micrometric scale. Besides, it was detected a strong release of ionic zinc to seawater. Oysters exposure to ZnONP for up to 48 h caused zinc accumulation initially in gill (24 and 48 h), followed by digestive gland (48 h). Electron microscopy analysis suggests the presence of endocytic vesicles containing ZnONP in both tissues. Analysis of antioxidant and oxidative stress markers points to a moderate oxidant effect of ZnONP in the cytosol, especially in gills after 48 h, causing lipid peroxidation, protein oxidation and glutathione reductase inhibition. Nevertheless, both ultrastructural and biochemical analyses highlight a mitochondrial disturbance pattern, with structural alterations and protein oxidation in gill and digestive gland. In general,

these studies allowed the conclusion that in bivalves, (i) electrophilic attacks can occur indiscriminately in the absence of a robust phase II biotransformation pathway in the gill, (ii) that oxidative damage can be accumulated in the absence of an effective antioxidant system, affecting animal survival, and (iii) bivalve mitochondria can be very susceptible to ZnONP.

Key words: glutathione, peroxidases, thioredoxin reductase; glutathione S-transferase, zinc oxide nanoparticles, bivalves, mercapturic acid pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama demonstrando efeitos das espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre o funcionamento celular.....	30
Figura 2: Estados de oxidação de tióis em proteínas.....	32
Figura 3: Esquema representando a atuação de tióis proteicos na ativação de vias de sinalização.....	34
Figura 4: Estrutura de derivados de aminoácidos gerados pela oxidação direta de cadeias laterais para a forma carbonílica.....	35
Figura 5: Esquema representando a atuação do sistema antioxidante na degradação de espécies reativas de oxigênio.....	36
Figura 6: Ciclo catalítico da superóxido dismutase citosólica (SOD-Cu/Zn) e mitocondrial (SOD-Mn)	37
Figura 7: Ciclo catalítico da catalase (Cat).....	38
Figura 8: Ciclo catalítico da glutatona peroxidase (GPx).....	39
Figura 9: Ciclo catalítico das peroxirredoxinas (Prx).....	41
Figura 10: Superoxidação e redução das peroxirredoxinas com duas cisteínas (2Cys-Prx)	42
Figura 11: Ciclo catalítico da glutatona redutase (GR).....	42
Figura 12: Ciclo catalítico da tiorredoxina redutase (TrxR).....	43
Figura 13: Processos de biotransformação de compostos exógenos.....	44
Figura 14: Esquema representando a via do ácido mercaptúrico.....	47
Figura 15: Metabolismo de biotransformação de quinonas (Q).....	61
Figura 16: Cromatograma representativo da análise dos níveis de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na água do mar.....	86
Figura 17: Cromatograma representativo dos padrões de 2,4-dinitrofenil-glutationa (DNP-SG), 2,4-dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) e 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC).....	86
Figura 18: Cromatograma representativo da análise dos níveis de 2,4-dinitrofenil-glutationa (DNP-SG), 2,4-dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) e 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC) na água do mar, brânquia, glândula digestiva e hemolinfa de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por 24 h.....	87
Figura 19: Níveis de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na água do mar e absorvância em 340 nm da água do mar durante exposição de ostras <i>Crassostrea gigas</i> a CDNB 10 µM.....	88
Figura 20: Níveis de 2,4-dinitrofenil-glutationa (DNP-SG) nos tecidos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> e na água do mar durante	

	exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por 24 h.....	89
Figura 21:	Níveis de 2,4-dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) nos tecidos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por 24 h.....	90
Figura 22:	Níveis de 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC) nos tecidos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por 24 h.....	91
Figura 23:	Níveis de glutatona total (GSH-t) e atividades enzimáticas em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por até 24 h.	96
Figura 24:	Níveis de transcritos de isoformas de glutatona S-transferase (GST) em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por até 24 h.....	97
Figura 25:	Níveis de glutatona total (GSH-t) e atividade enzimática em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas por 24 h a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) pelo sistema circulatório.....	99
Figura 26:	Níveis de glutatona total (GSH-t) em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas por 1 h ao agente eletrofílico N-etilmaleimida (NEM) via água do mar ou via hemolinfa.....	100
Figura 27:	Níveis de glutatona total (GSH-t) em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> pré-expostas a N-etilmaleimida (NEM) por 1 h seguido de exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 24 h.....	101
Figura 28:	Atividades enzimática da glutatona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR) em brânquias de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a ZnCl ₂ ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) durante 18 h.....	102
Figura 29:	Atividades enzimáticas da glutatona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR) em brânquias de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) durante 18 h.....	103
Figura 30:	Efeitos dos inibidores ZnCl ₂ ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na sobrevivência de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a hidróperóxido de cumeno (CHP).....	105

Figura 31: Efeitos da exposição à $ZnCl_2$ ou à 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na taxa de detoxificação de peróxido exógeno <i>in vivo</i> em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a hidroperóxido de cumeno (CHP).....	106
Figura 32: Efeitos da pré-exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na capacidade de detoxificação de peróxidos exógenos e na mortalidade induzida por menadiona (Men) em ostras <i>Crassostrea gigas</i>	107
Figura 33: Atividades enzimática da menadiona redutase (Men redutase) e NAD(P)H citocromo C redutase em brânquias de ostras <i>Crassostrea gigas</i> após exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μ M por 18 h.....	108
Figura 34: Efeitos da exposição à $ZnCl_2$ ou à 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) sobre o estado tiólico de brânquia de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a hidroperóxido de cumeno (CHP).....	110
Figura 35: Níveis de tióis em brânquia de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas à 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e/ou à menadiona (Men).....	111
Figura 36: Efeitos da exposição ao $ZnCl_2$ ou ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) sobre a densidade celular e viabilidade celular de hemócitos circulantes de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a hidroperóxido de cumeno (CHP).....	112
Figura 37: Viabilidade celular e dano ao DNA em hemócitos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e/ou à menadiona (Men).....	113
Figura 38: Caracterização de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP).....	114
Figura 39: Teste de toxicidade aguda em ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas à nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e $ZnCl_2$	115
Figura 40: Análise dos níveis de zinco na água do mar, brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	117
Figura 41: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células ciliadas e com microvilos de filamentos branquiais de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas à 4 mg/L nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h.....	120
Figura 42: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células digestivas da glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i>	

	expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h.....	122
Figura 43:	Análise do estado tiólico de brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> após exposição a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h..	123
Figura 44:	Análise da atividade de enzimas antioxidantes e dos níveis de peroxidação lipídica de brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> após exposição a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h..	124
Figura 45:	Imagens representativas de géis de 1DE SDS-PAGE de extratos proteicos mitocondriais de brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e analisados para a detecção do conteúdo de tióis proteicos livres.....	126
Figura 46:	Imagens representativas de géis de 1DE SDS-PAGE de extratos proteicos mitocondriais de brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e analisados para a detecção do conteúdo de grupos carbonilas em proteínas.....	127
Figura 47:	Análise dos níveis de tióis proteicos livres em proteínas mitocondriais por 1DE SDS-PAGE em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 24 ou 48 h.....	128
Figura 48:	Atividade da enzima mitocondrial citocromo c oxidase (complexo IV) em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 24 ou 48 h.....	128
Figura 49:	Imagens representativas de géis 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos de brânquias de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h.....	130
Figura 50:	Representação gráfica do número de proteínas com grupos tiólicos livres detectados em extratos proteicos citosólicos analisados por 2DE SDS-PAGE de brânquias de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h.....	131
Figura 51:	Representação gráfica do número de proteínas com grupos carbonilas detectadas em extratos proteicos citosólicos analisados por 2DE SDS-PAGE de brânquias de ostras	

	<i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h.....	133
Figura 52:	Representação gráfica do número de proteínas com diferentes perfis de expressão detectados em extratos proteicos citosólicos analisados por 2DE SDS-PAGE de brânquias de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h	135
Figura 53:	Hipótese levantada sobre o papel da brânquia na proteção contra agentes eletrofílicos em ostras <i>Crassostrea gigas</i> ..	138
Figura 54:	Hipótese levantada sobre os efeitos da inibição das enzimas glutationa redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR) por zinco (ZnCl ₂) ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em mexilhões <i>Perna perna</i>	155
Figura 55:	Hipótese levantada sobre os efeitos da inibição do sistema antioxidante causado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na toxicidade da menadiona (Men) em ostras do Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	157
Figura 56:	Hipótese levantada sobre os efeitos de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) em ostras do Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	158
Figura 57:	Esquema representando o papel dos sistemas de defesa antioxidante e de biotransformação em bivalves expostos a agentes oxidantes e eletrofílicos.....	169

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Parâmetros analisados nos diferentes estudos realizados com mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas* expostas a agentes oxidantes e eletrofílicos.....65
- Tabela 2: Genes selecionados com suas respectivas sequências de iniciadores utilizados para as análises de qPCR e números de acesso no GenBank.....70
- Tabela 3: Visão geral dos níveis de metabólitos e seu tempo de permanência nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 24 h.....93
- Tabela 4: Lista de “spots” detectados por 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos marcados com 5-iodoacetamida fluoresceína (IAF), os quais apresentaram variações nos grupos tiólicos livres em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 48h, em relação ao grupo controle.....131
- Tabela 5: Lista de “spots” detectados por 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos marcados com 5-tiosemicarbazida-fluoresceína (FTSC) para a detecção de proteínas contendo grupos carbonilas em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 48h.....133
- Tabela 6: Lista de “spots” detectados por 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos corados com Coomassie coloidal para detecção de diferentes níveis de expressão proteica em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 48h.....135

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Representação da distribuição de cada metabólito entre os diferentes tecidos analisados em ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a CDNB 10 μ M por 24 h.....	198
Anexo 2: Representação da distribuição dos diferentes metabólitos analisados em cada tecido de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a CDNB 10 μ M por 24 h.....	200

LISTA DE ABREVIATURAS

1Cys Prx - peroxirredoxina com 1 cisteína
1DE - eletroforese unidimensional
2Cys Prx - peroxirredoxinas contendo 2 cisteínas
2Cys Prx atípicas - peroxirredoxinas atípicas contendo 2 cisteínas
2DE - eletroforese bidimensional
AAC - área abaixo da curva
ABC - do inglês *ATP-binding cassette*
Cat - catalase
CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHP - hidroperóxido de cumeno
DNP-Cys - 2,4-dinitrofenil-cisteína
DNP-NAC - 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína
ERO - espécies reativas de oxigênio
FTSC - 5-tiosemicarbazida-fluoresceína
G6PDH - glicose 6-fosfato desidrogenase
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGT - gamma-glutamil transpeptidase
GPx - glutationa peroxidase
GR - glutationa redutase
GSH - glutationa
GSH/GSSG - relação glutationa reduzida/dissulfeto de glutationa
GSH-t - glutationa total
GSSG - dissulfeto de glutationa
GST - glutationa S-transferase
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IAF - 5-iodoacetamida-fluoresceína
Keap1 - do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*
Kpi - tampão fosfato de potássio
Men - Menadiona
Men redutase - Menadiona redutase
MET - microscopia eletrônica de transmissão
NEM - N-etilmaleimida
Nrf2 - do inglês *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
O₂⁻ - ânion superóxido
OH⁻ - radical hidroxila
PBS - tampão fosfato salina
PCA - ácido perclórico
Prx - peroxirredoxina

Prx6 - peroxirredoxina isoforma 6
PSH - tióis proteicos
SDS-PAGE - eletroforese desnaturante em géis de poli(acrilamida)
-SH - grupo tiol
SO₂ - ácido sulfínico
SO₃ - ácido sulfônico
SOD - superóxido dismutase
SOD-CuZn - superóxido dismutase contendo cobre e zinco em seu sítio ativo
SOD-Mn - superóxido dismutase contendo manganês em seu sítio ativo
SOH - ácido sulfênico
S-S - ponte dissulfeto
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
Trx - tioredoxina
Trx_{ox} - tioredoxina oxidada
TrxR - tioredoxina redutase
Trx_{red} - tioredoxina reduzida
VN - vermelho neutro
ZnCl₂ - cloreto de zinco
ZnONP - nanopartículas de óxido de zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	55
1.1.	DEFESAS ANTIOXIDANTES	29
1.2.	SISTEMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	43
1.3.	O ESTUDO DOS SISTEMAS DE DEFESAS CELULARES EM BIVALVES NA ECOTOXICOLOGIA	48
1.3.1	Nanomateriais	54
1.4.	ESTRATÉGIAS DE PESQUISA UTILIZADAS	57
1.4.1.	Investigação do processo de biotransformação de fase II e da via do ácido mercaptúrico em bivalves	57
1.4.2.	Inibição do sistema antioxidante e o uso de agentes oxidantes	59
1.4.3.	Alterações redox em proteínas	61
2.	OBJETIVOS	63
2.1.	OBJETIVO GERAL	63
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1.	ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO (ESTUDOS 1-3).....	65
3.2.	ESTUDO 1	66
3.2.1.	Delineamento experimental	66
3.2.2.	Síntese de padrões de metabólitos do CDNB da via do ácido mercaptúrico	67
3.2.3.	Quantificação dos níveis de CDNB e de metabólitos da via do ácido mercaptúrico na água do mar e tecidos de ostras	68
3.2.4.	Quantificação dos níveis de glutatona total	69
3.2.5.	Ensaio enzimático e de peroxidação lipídica	69
3.2.6.	Análises de transcrição gênica	70
3.2.7.	Análises estatísticas	71
3.3.	ESTUDO 2	71
3.3.1.	Delineamento experimental	71
3.3.2.	Ensaio enzimático	73
3.3.3.	Avaliação da capacidade de detoxificação de peróxido <i>in vivo</i>	73
3.3.4.	Mortalidade de ostras e mexilhões a agentes oxidantes	74
3.3.5.	Quantificação dos níveis de glutatona total, dissulfeto de glutatona e tióis proteicos na brânquia	75
3.3.6.	Análises celulares e de imunocompetência em hemócitos	75

3.3.7.	Análises estatísticas.....	76
3.4.	ESTUDO 3.....	77
3.4.1.	Caracterização de ZnONP	77
3.4.2.	Delineamento experimental.....	78
3.4.3.	Quantificação dos níveis de zinco	78
3.4.4.	Análise de tecidos por MET	79
3.4.5.	Análise dos níveis de glutathiona total, dissulfeto de glutathiona e tióis proteicos.....	79
3.4.6.	Análises celulares e de imunocompetência em hemócitos.....	79
3.4.7.	Ensaio enzimático e detecção dos níveis de peroxidação lipídica.....	80
3.4.8.	Análises de proteômica.....	81
3.4.9.	Análises estatísticas.....	84
4.	RESULTADOS	85
4.1.	ESTUDO 1.....	85
4.1.1.	Padronização da análise de CDNB e metabólitos em água do mar e tecidos de ostras <i>C. gigas</i>	85
4.1.2.	Absorção de CDNB, metabolização e excreção de metabólitos por <i>C. gigas</i>	87
4.1.3.	Efeitos do CDNB sobre o sistema antioxidante e sobre a enzima GST em <i>C. gigas</i>	94
4.1.4.	Investigação do papel protetor da brânquia contra agentes eletrofílicos.....	97
4.2.	ESTUDO 2.....	102
4.2.1.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB sobre as enzimas auxiliares GR e TrxR em mexilhões e ostras	102
4.2.2.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB na susceptibilidade de mexilhões e ostras a CHP e Men.....	103
4.2.3.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB sobre o estado tiólico de mexilhões e ostras expostas ao CHP ou à Men	109
4.2.4.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB em hemócitos de mexilhões e de ostras expostas ao CHP ou à Men.....	111
4.3.	ESTUDO 3.....	113
4.3.1.	Caracterização das ZnONP.	113
4.3.2.	Ensaio de toxicidade aguda com ZnONP e ZnCl ₂ com ostras <i>C. gigas</i>	115
4.3.3.	Quantificação dos níveis de zinco e análises de microscopia eletrônica	116
4.3.4.	Análises bioquímicas de ostras <i>C. gigas</i> expostas a ZnONP.....	122

4.3.5.	Efeitos de ZnONP em hemócitos de <i>C. gigas</i>	124
4.3.6.	Efeitos de ZnONP no perfil geral de oxidação de proteínas citosólicas e mitocondriais em <i>C. gigas</i>	125
4.3.7.	Identificação de proteínas de <i>C. gigas</i> sensíveis à exposição de ZnONP	129
5.	DISCUSSÃO	138
5.1.	ESTUDO 1	138
5.1.1.	Absorção, metabolização e excreção de CDNB	139
5.1.2.	Modulação do sistema antioxidante e de biotransformação por CDNB	143
5.1.3.	Brânquia como uma barreira metabólica efetiva contra agentes eletrofílicos	145
5.2.	ESTUDO 2	147
5.2.1.	Pré-tratamento com ZnCl ₂ e CDNB em mexilhões e ostras.....	147
5.2.2.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB na taxa de degradação de peróxido <i>in vivo</i>	149
5.2.3.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB em hemócitos de mexilhões e ostras expostas a agentes oxidantes	150
5.2.4.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB sobre o estado tiólico de mexilhões e ostras expostas a agentes oxidantes.....	151
5.2.5.	Efeitos do ZnCl ₂ e CDNB sobre a sobrevivência de mexilhões e ostras expostas a agentes oxidantes.....	154
5.3.	ESTUDO 3	158
5.3.1.	Caracterização e toxicidade aguda e incorporação de ZnONP.....	159
5.3.2.	Efeito da exposição à ZnONP em hemócitos.....	161
5.3.3.	Alterações citosólicas causadas por ZnONP	161
5.3.4.	Alterações mitocondriais causadas por ZnONP.....	164
6.	CONCLUSÕES	167
7.	REFERÊNCIAS	171
8.	ANEXOS	197

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEFESAS ANTIOXIDANTES

Em organismos aeróbios, o metabolismo celular depende de processos altamente energéticos, sendo o oxigênio a molécula indispensável para a produção de energia em grandes quantidades. Através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o oxigênio é reduzido à água enquanto adenosina trifosfato (ATP) é gerada como o principal combustível celular. Este processo aumenta em diversas vezes a quantidade de energia produzida quando comparado com organismos sob metabolismo anaeróbio, os quais não utilizam o oxigênio no processo de produção de ATP. Essa diferença é fundamental para compreender a toxicidade do oxigênio, uma vez que organismos sob metabolismo anaeróbio podem viver na presença do oxigênio sem contar com os efeitos tóxicos de sua utilização. Já no caso de organismos aeróbios, durante seu metabolismo a taxa de consumo de oxigênio pode ser elevada, principalmente em mamíferos, chegando a valores como 400g/dia no caso de humanos, aumentando a probabilidade de produção de derivados tóxicos do oxigênio durante este processo. Dessa forma, ao mesmo tempo em que o oxigênio é fundamental para a célula em organismos aeróbios, seu metabolismo pode ser um risco para a estrutura, funcionamento e homeostase celular (INOUE et al., 2003; MCCORD, 2000).

Estas substâncias derivadas do metabolismo do oxigênio, como o oxigênio *singlet*, radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO). Elas também são produzidas por reações de oxidação catalisadas, por exemplo, pela presença de metais de transição ou mesmo enzimaticamente. Na célula, a mitocôndria é considerada uma das principais fontes de produção de ERO, porém outros processos fisiológicos (*e.g.* biotransformação de compostos) também podem gerar essas moléculas reativas. ERO podem mediar danos reversíveis e irreversíveis a aminoácidos, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, o que pode ter sido uma das principais fontes de pressão evolutiva para o aparecimento de defesas antioxidantes capazes de prevenir, eliminar ou reparar os danos causados pelas ERO (SIES, 1997; TURRENS, 2003). Enquanto níveis elevados de ERO podem causar distúrbios celulares, moderados níveis dessas espécies também atuam em processos de sinalização, proliferação e sobrevivência celular

(TRACHOOTHAM et al., 2008), tornando os processos de regulação redox importantes mecanismos celulares (Fig. 1).

A proteção contra ERO é realizada pelas defesas antioxidantes. Uma alteração entre a produção de ERO e a sua neutralização pode causar distúrbios na manutenção do estado redox celular, comprometendo o funcionamento de enzimas, organelas e via metabólicas, afetando a sobrevivência celular (Fig. 1). Desta forma, caracterizamos de estresse oxidativo um desbalanço entre os níveis de agentes oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros, podendo comprometer a homeostase celular (SIES, 1997).

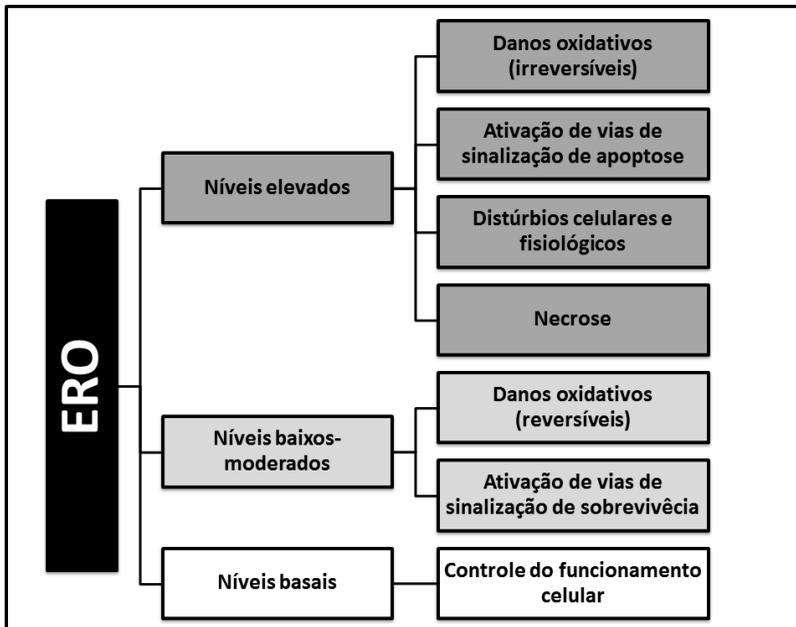


Figura 1: Diagrama demonstrando efeitos das espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre o funcionamento celular. As ERO participam normalmente de diversos processos fisiológicos. Porém, quando produzidas de maneira descontrolada podem causar danos oxidativos e regulação de vias de sinalização relacionadas com sobrevivência. Já uma produção contínua de altos níveis de ERO pode acarretar em efeitos adversos como distúrbios fisiológicos e necrose.

É importante ressaltar que uma nova teoria do estresse oxidativo está sendo discutida recentemente, chamada de “hipótese redox”. Ela discute a possibilidade de que não seja necessário um acúmulo demasiado de danos oxidativos e de ERO para alterar o funcionamento

celular, mas sim através do distúrbio de centros específicos de controle redox celular (proteínas muito sensíveis a ERO que atuam como primeiro alvo de oxidações). Nestes eventos, estas proteínas podem ser moduladas, ativando ou desativando processos celulares e fisiológicos, e conseqüentemente, afetando o funcionamento da célula (JONES, 2008). Porém, ambas as teorias do estresse oxidativo (de Sies e de Jones) apontam para o papel central das defesas antioxidantes no processo de manutenção do funcionamento celular durante situações fisiológicas e patológicas.

Apesar de possuírem ações oxidantes deletérias, ERO também podem atuar como importantes moléculas de sinalização no controle do funcionamento celular. Por exemplo, o H_2O_2 está sendo considerado recentemente como um dos principais segundo mensageiros, junto com ATP e Ca^{2+} . Isso ocorre devido a sua alta taxa de difusão celular e tecidual, porém com baixa promiscuidade: ele oxida preferencialmente resíduos de cisteínas expostas com baixo pK_a (os quais não são amplamente distribuídos em proteínas), permitindo uma especificidade necessária para atuar em processos de sinalização (SIES, 2014). Podemos citar como exemplos da ação de ERO em processos de sinalização celular: o controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais e a ativação da resposta imunológica contra patógenos (DRÖGE, 2002).

Existem duas categorias de antioxidantes celulares, os enzimáticos e os não enzimáticos. Ácido ascórbico, tocoferóis, carotenos, flavonóides, ácido úrico e glutathiona (GSH) estão entre os antioxidantes não enzimáticos de maior importância para as células de organismos aeróbios. O tripeptídeo GSH, o qual contém um grupamento tiol (-SH) reativo, merece um destaque especial. Sua capacidade antioxidante e sua reatividade estão relacionadas com o grupo -SH do resíduo de cisteína, além de ser encontrado em altas concentrações dentro da célula (até 10 mM). A GSH é cofator de diversas enzimas, atuando na eliminação de ERO e na conjugação de compostos eletrofílicos. Durante algumas dessas reações enzimáticas, a GSH é reversivelmente oxidada a dissulfeto de glutathiona (GSSG). A manutenção de altos índices da relação GSH/GSSG permite a manutenção do ambiente redutor intracelular e a sobrevivência da célula, sendo a redução da GSSG essencial para sobrevivência celular (HAYES; MCLELLAN, 1999; KEHRER; LUND, 1994). Essa regulação do ambiente redutor é chamada de regulação redox, onde a produção de ERO e os níveis de defesas antioxidantes são

cuidadosamente controlados, evitando a oxidação generalizada de tióis e de outras moléculas celulares.

Outra importante defesa antioxidante é o grupo -SH presente nas cisteínas de proteínas. Em humanos, é estimada que a quantidade de tióis totais (reativos e não reativos) presentes em proteínas seria na ordem de 20.000 $\mu\text{mol/kg}$ enquanto que os níveis de glutathione (o tiol de baixo peso molecular mais abundante na célula) ficam em torno de 1.000 a 10.000 $\mu\text{mol/kg}$, tornando os tióis proteicos (PSH) importantes estruturas para os processos de defesa celular e regulação metabólica (JONES, 2008). Além de participarem diretamente na neutralização de ERO, os PSH também podem participar de processos de regulação redox celular. Assim como a cisteína da GSH, as cisteínas reativas/acessíveis das proteínas podem sofrer processos de oxidação-redução reversíveis ou irreversíveis (Fig. 2).

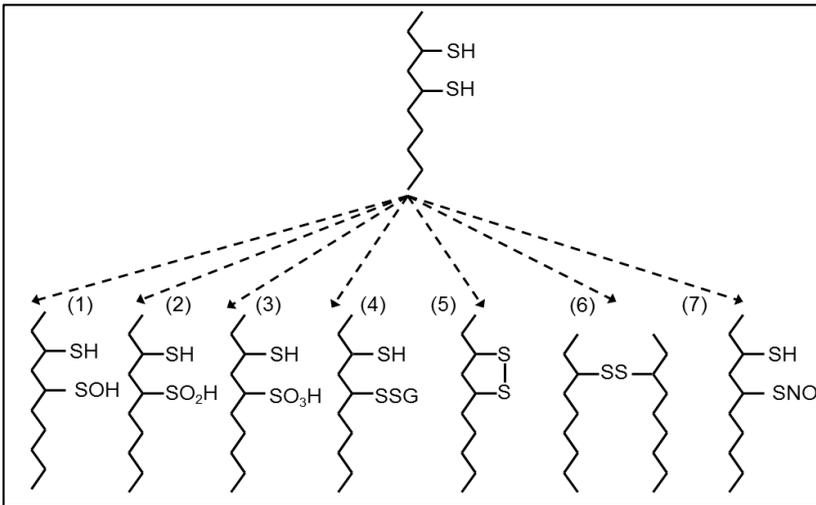


Figura 2: Estados de oxidação de tióis em proteínas. Tióis (-SH) são encontrados nas cisteínas da estrutura de diversas proteínas, muitas vezes em seu sítio ativo. O metabolismo celular pode causar alterações no estado desses grupos, gerando diferentes derivados. (1) Ácido sulfênico; (2) ácido sulfínico; (3) ácido sulfônico; (4) conjugado proteína-glutathione (glutathionilação); (5) ponte dissulfeto intramolecular; (6) ponte dissulfeto intermolecular; (7) S-nitrosotiol (S-nitrosilação). Modificado de Wang et al., 2012.

Estas cisteínas proteicas são muito sensíveis a alterações no estado redox celular, ou seja, no balanço entre os agentes oxidantes e redutores celulares. Dentro dessas modificações, podemos citar (Fig. 2):

glutationilação, ponte dissulfeto entre a glutatona e a proteína; formação de SOH, SO₂ ou SO₃; pontes dissulfeto inter ou intramolecular e S-nitrosilação (WANG et al., 2012a). Dentre essas formas de oxidação, as de menor toxicidade são a S-nitrosilação, formação de SOH e pontes dissulfetos inter ou intramoleculares, uma vez que são reversíveis e capazes de utilizar tampões redox intracelulares para sua redução, como a tiorredoxina e GSH (BENHAR et al., 2009; MEYER et al., 2009).

Como exemplo de processos de oxidação de -SH relacionados com eventos de sinalização celular, -SH presentes na proteína Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*) estão na forma reduzida durante o estado basal da célula. Porém alterações pró-oxidantes no estado redox celular são rapidamente detectadas por essa molécula, causando a oxidação desses -SH (Fig. 3). Nessa situação, o Keap1 é desligado do fator de transcrição Nrf2 (do inglês *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), o qual aumenta sua estabilidade e é direcionado ao núcleo. Esta translocação ativa a transcrição de genes relacionados a inúmeras defesas antioxidantes e enzimas relacionadas à fase II de metabolização de compostos eletrofílicos. Dessa forma, a ativação do fator de transcrição Nrf2 aumenta a capacidade de defesa da célula (BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2011; DINKOVA-KOSTOVA et al., 2002).

É interessante observar que essas alterações no estado redox das cisteínas em proteínas podem ser originadas, não exclusivamente, durante a neutralização direta de ERO. Estas oxidações podem modular a atividade de várias proteínas, tanto através da inativação como da ativação das enzimas. Desta forma, a oxidação e redução de cisteínas pode contribuir para a regulação de diferentes vias metabólicas ou processos de sinalização celular (CHOUCHANI et al., 2011). Consequentemente, as proteínas podem ser consideradas importantes alvos biológicos de ERO tanto em situações fisiológicas como patológicas, participando ativamente do processo de regulação redox celular. A oxidação de tióis de proteínas não ocorre de uma maneira indiscriminada. Fatores como o pH, *pKa*, acessibilidade do grupamento -SH, localização celular, tipo de ERO e outros fatores influenciam na reatividade de -SH de proteínas (BRANDES et al., 2011). Podemos imaginar que existam alvos com diferentes níveis de sensibilidade à oxidação, caracterizando a presença de proteínas sensíveis e insensíveis a alterações redox na célula, ou seja, proteínas com cisteínas que podem sofrer oxidação em situações celulares específicas.

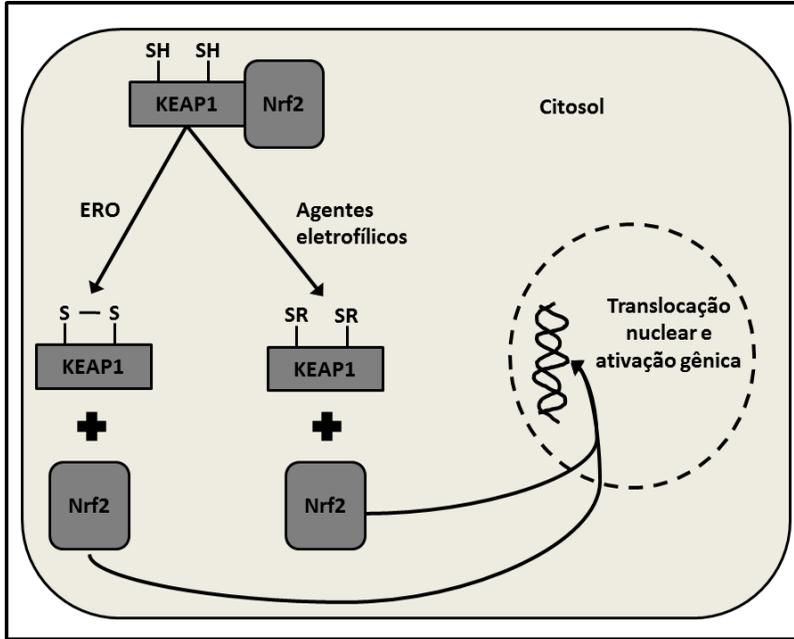


Figura 3: Esquema representando a atuação de tóxis proteicos na ativação de vias de sinalização. Em situações fisiológicas, o fator de transcrição Nrf2 (do inglês *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) encontra-se associado à proteína Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*) no citosol, tornando-se inativo. Em situações de alteração do estado redox, com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou na presença de agentes eletrofílicos, ocorre a oxidação (S-S) ou ligação covalente tior-agente eletrofílico (SR) das cisteínas da Keap1, respectivamente. Essas alterações causam a dissociação do Nrf2, o qual pode ser translocado ao núcleo e se ligar em regiões gênicas promotoras específicas, causando a indução de genes relacionados a defesas antioxidantes e de biotransformação.

Agentes oxidantes também podem causar a formação de grupos carbonílicos (aldeídos e cetonas) nas cadeias laterais de proteínas. Resíduos de prolina, lisina, arginina e treonina são os aminoácidos mais sensíveis à carbonilação, gerando diferentes compostos finais (Fig. 4). Estas modificações também podem causar alterações estruturais nas proteínas, ocasionando perda de atividade e de função biológica (DALLE-DONNE et al., 2003). Apesar de ter sido proposto como um evento oxidativo irreversível (DALLE-DONNE, 2005; NYSTROM, 2005) estudos apontaram a diminuição dos níveis de carbonilação de proteínas sem ocorrer alterações na sua expressão protéica (WONG et

al., 2008), sugerindo eventos de reversão de carbonilação a nível enzimático utilizando NADPH e proteínas contendo –SH (WONG et al., 2012).

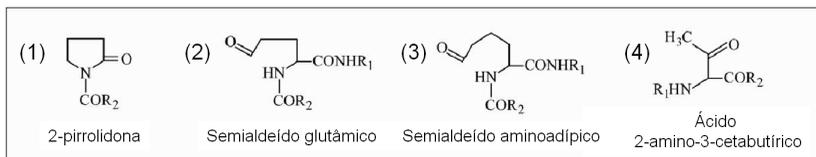


Figura 4: Estrutura de derivados de aminoácidos gerados pela oxidação direta de cadeias laterais para a forma carbonílica. Carbonilas derivados de resíduos de: (1) prolina; (2) arginina e prolina; (3) lisina; (4) treonina. O restante da cadeia carbônica das proteínas é representado por R₁ e R₂. Modificado de Dalle-Donne et al. (2003).

Eventos de peroxidação lipídica também são comuns em células sob efeito de agentes oxidantes. O ataque a cadeias de ácidos graxos poliinsaturados pode ocorrer através uma reação em cadeia envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-) através do ataque de uma molécula reativa, como ERO, formando um radical centrado em carbono. Este radical pode ser alvo de moléculas de oxigênio e formar um radical peroxil (ROO[•]). Este radical possui a capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metileno de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico), e conseqüentemente, gerando novos ROO[•] e iniciando a etapa de propagação da oxidação dos ácidos graxos. Quando o ROO[•] ataca uma cadeia adjacente, ele é transformado em um peróxido lipídico, o qual é geralmente estável sob temperatura fisiológica e com baixa capacidade oxidativa, porém também capaz de realizar a propagação de eventos de peroxidação lipídica e geração de ERO na presença de íons metálicos de transição. Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo dos reagentes, dentre outros. (HALLIWELL *et al.*, 2007).

A fim de evitar a ocorrência desses eventos oxidativos de maneira indiscriminada, diferentes enzimas participam da proteção celular contra ERO (Fig. 5), os quais atuam de maneira específica e coordenada a fim de auxiliar na manutenção dos níveis de ERO.

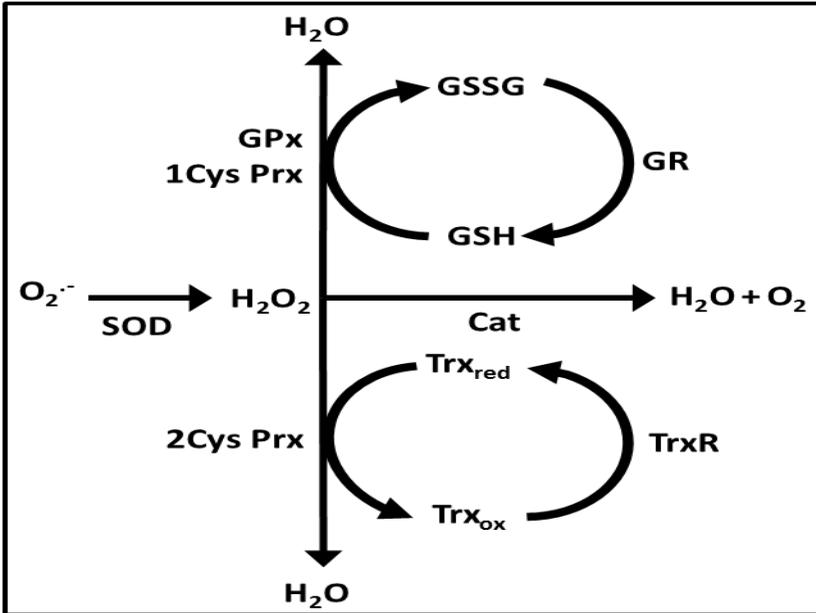


Figura 5: Esquema representando a atuação do sistema antioxidante na degradação de espécies reativas de oxigênio. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é inicialmente dismutado a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD). Em seguida, 3 sistemas atuam na degradação do H_2O_2 : a catalase (Cat), gerando oxigênio e água; a glutatona peroxidase (GPx) e peroxidirredoxina contendo 1 cisteína (1Cys Prx), que em conjunto com a glutatona (GSH) geram água e o dissulfeto de glutatona (GSSG); e as peroxidirredoxinas contendo 2 cisteínas (2Cys Prx) que em conjunto com a tiorredoxina (Trx_{red}) geram água e a forma oxidada da tiorredoxina (Trx_{ox}). Tanto a GSSG como a Trx_{ox} são constantemente reduzidas a GSH e Trx_{red} pelas enzimas glutatona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR), respectivamente.

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que age sobre o radical $O_2^{\cdot-}$ dismutando-o a H_2O_2 (Fig. 6), protegendo os alvos do ataque do ânion superóxido. Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn (com cobre e zinco em seu sítio ativo), e na mitocôndria a forma SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo). A SOD-CuZn é capaz de aumentar a taxa de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em 3 ordens de grandeza, através de reações redox do cobre presente em sua estrutura: após a redução do Cu^{2+} a Cu^+ pelo ânion superóxido, ocorre a formação de oxigênio molecular. Em seguida, a reação com outro $O_2^{\cdot-}$, na presença de prótons, causa a

oxidação do Cu^+ a Cu^{2+} e formação de H_2O_2 . No caso da SOD-Mn, a reação ocorre da mesma forma que com o cobre da SOD-Cu/Zn, através da redução do Mn^{3+} a Mn^{2+} e a formação de oxigênio molecular, seguido da oxidação do Mn^{2+} a Mn^{3+} na presença de prótons e outro O_2^- , gerando H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Um recente trabalho demonstrou que a SOD-Cu/Zn também pode atuar como um fator de transcrição gênica, sendo translocada ao núcleo em situações de estresse oxidativo e ativando a transcrição de genes antioxidantes e de reparo celular (TSANG et al., 2014). Esse dado reforça o papel central das enzimas antioxidantes na defesa contra ERO, direta ou indiretamente.

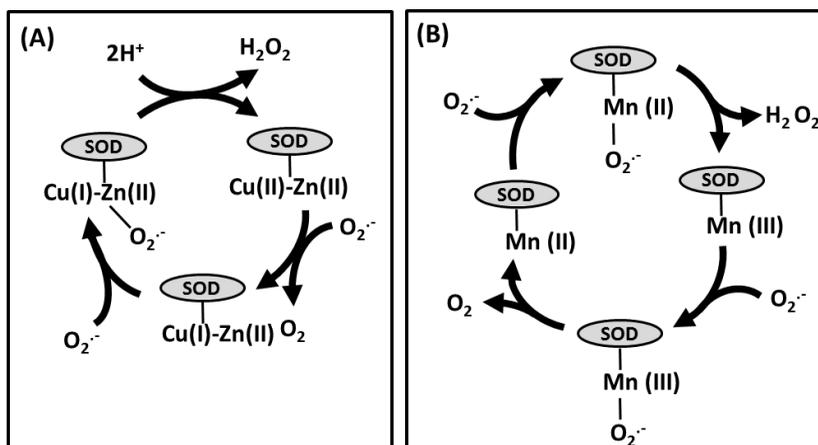


Figura 6: Ciclo catalítico da superóxido dismutase citosólica (SOD-Cu/Zn) e mitocondrial (SOD-Mn). (A) Contendo Cu e Zn no sítio catalítico, a SOD realiza a transformação do ânion superóxido (O_2^-) a O_2 através da redução do Cu^{2+} (Cu (II)) a Cu^+ (Cu(I)) em seu sítio ativo. Em seguida, outra molécula de O_2^- causa a oxidação do Cu(I) a Cu(II), gerando 1 molécula de H_2O_2 ao fim do processo. O zinco não atua no ciclo catalítico, apenas auxilia na estabilização da enzima. (B) O mecanismo da SOD (Mn) é semelhante, exceto pela utilização de Mn nas reações de oxidoredução, transitando entre os estados Mn^{3+} (Mn(III)) e Mn^{2+} (Mn(II)). Modificado de Halliwell e Gutteridge (2007).

A decomposição do H_2O_2 é realizada por pelo menos 3 diferentes sistemas enzimáticos. Um deles é o da catalase (Cat), uma hemoproteína responsável pela dismutação do H_2O_2 para oxigênio molecular (Fig. 7). A Cat é encontrada principalmente nos peroxissomas, mas também pode

ser encontrada no citosol ou no ambiente extracelular como o plasma sanguíneo (ZÁMOCKÝ; KOLLER, 1999).

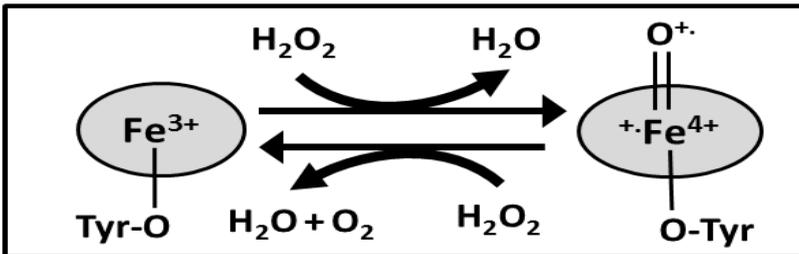


Figura 7: Ciclo catalítico da catalase (Cat). Contendo um grupo heme ligado à proteína por um resíduo de tirosina (Tyr), a Cat realiza a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 a uma molécula de O_2 e duas de H_2O . Inicialmente, uma molécula de H_2O_2 é reduzida a água oxidando o Fe^{3+} do grupo heme a Fe^{4+} (com uma oxidação adicional de um elétron no grupo heme ($^+\text{Fe}^{4+}$)). Em seguida, outra molécula de H_2O_2 é oxidada a H_2O e O_2 , retornando grupo heme ao estado inicial Fe^{3+} . Modificado de Halliwell e Gutteridge (2007).

O H_2O_2 também pode ser decomposto pela glutathione peroxidase (GPx). Esta selenoproteína é capaz de reduzir peróxidos orgânicos e de hidrogênio e é encontrada no citosol, mitocôndria, plasma sanguíneo e nos fluídos extracelulares, além de existir uma GPx que degrada peróxidos lipídicos localizada na membrana celular. O selênio se encontra presente na forma de selenocisteína no sítio ativo (Fig. 8), enquanto que a GSH fornece os equivalentes redutores para a remoção de peróxido (FLOHE; GÜNZLER; SCHOCK, 1973; GAMBLE; WISEMAN; GOLDFARB, 1997; MICHIELS et al., 1994).

A peroxirredoxina (Prx) é outra família de proteínas capaz de decompor peróxidos que contém uma cisteína peroxidática em seu sítio ativo, a qual é responsável pela redução do peróxido (Fig. 9). Pode ser encontrada no citosol, núcleo, membranas, mitocôndria, complexo de Golgi, peroxisomo e fluídos extracelulares. As Prxs formam uma família de enzimas capazes de detoxificar peróxidos de hidrogênio, peróxidos orgânicos de longa cadeia, de fosfolipídios e de ácidos graxos, além de peroxinitrito, dependendo de sua isoforma ou da espécie em questão (POOLE; HALL; NELSON, 2011). Exceto para a isoforma Prx6, essas enzimas contém duas cisteínas no sítio ativo. Uma delas é um tiol peroxidático, que se oxida a ácido sulfênico (SOH) durante o ciclo catalítico. A outra é uma cisteína de resolução, que ataca o SOH gerando uma ponte dissulfeto (S-S) intermolecular (2Cys-Prx típica ou isoformas

Prx1 – Prx4) ou intramolecular (2Cys-Prx atípica ou isoforma Prx5). A ponte dissulfeto formada no ciclo catalítico é reduzida pela tioredoxina. No caso da peroxidoredoxina contendo uma cisteína (1Cys-Prx ou isoforma Prx6), o SOH formado na redução do peróxido não é atacado pela cisteína da enzima, mas sim pela GSH (RHEE; CHAE; KIM, 2005). A redução do SOH (1Cys-Prx) ou da S-S (2-Cys-Prx típicas e atípicas) permitem a regeneração das formas ativas da Prx.

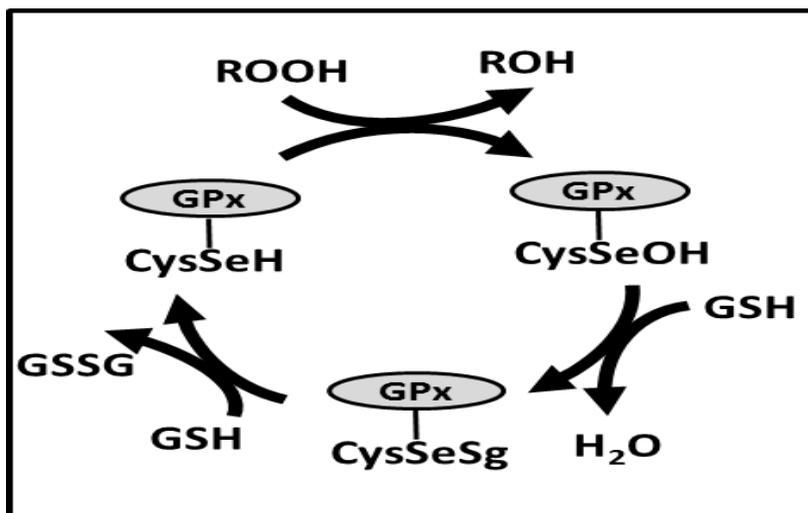


Figura 8: Ciclo catalítico da glutatona peroxidase (GPx). A GPx possui uma selenocisteína no seu sítio ativo, que quando reduzida encontra-se na forma de selenol (CysSeH). O selenol é oxidado por peróxidos (ROOH) a ácido selênico (CysSeOH). Em sequência, uma glutatona (GSH) reage com o ácido selênico, formado o selenil dissulfeto (CysSeSG). Uma segunda molécula de GSH ataca o enxofre desse grupamento, gerando dissulfeto de glutatona (GSSG) e regenerando o selenol, completando o ciclo catalítico. Modificado de Ren et al. (2001).

Uma característica interessante da Prx é que uma elevação moderada nos níveis de ERO pode causar a superoxidação da cisteína, gerando ácido sulfínico (SO₂) ou sulfônico (SO₃) (Fig. 10). Estas formas de oxidação não podem ser reduzidas pela Trx, causando uma perda temporária na sua atividade enzimática. Desta forma, a Prx pode atuar como um “interruptor redox”: na presença de níveis ligeiramente elevados de H₂O₂, seu ciclo catalítico funciona corretamente, prevenindo o acúmulo intracelular de peróxido; em situações com níveis

moderados ou altos de H_2O_2 , a Prx é inativada via superoxidação, facilitando um acúmulo inicial intracelular de H_2O_2 e consequentemente a ativação de vias de sinalização celular específicas (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008; WINTERBOURN, 2013). Por exemplo, é estimado que menos de 0,01% da Prx1 encontra-se na forma superoxidada durante seu funcionamento em níveis basais de H_2O_2 , demonstrando que a inativação da enzima via superoxidação deve ocorrer em momentos de ciclos catalíticos muito ativos, como no caso de concentrações de H_2O_2 acima do normal, porém não tóxicos (YANG et al., 2002). A reativação das formas superoxidadas da Prx ocorre através da enzima sulforedoxina, descoberta recentemente (BITEAU; LABARRE; TOLEDANO, 2003). Até o presente momento, as Prx são as únicas proteínas conhecidas com cisteínas superoxidadas (nas formas SO_2 e SO_3) que podem ser reduzidas enzimaticamente ao seu estado basal (SOH, Fig. 10).

Durante a ação peroxidática da Prx e da GPx, agentes redutores são usados como fonte de elétrons. Durante sua atividade catalítica a GPx utiliza GSH como doador de elétrons: duas moléculas de GSH são utilizadas para regenerar a selenocisteína e formando uma molécula de GSSG (Fig. 8). Dessa forma, a GPx é capaz de degradar peróxidos porém mantendo sua forma reduzida às custas de GSH (HAYES; MCLELLAN, 1999). Já no caso da Prx, a ponte dissulfeto gerada durante seu ciclo catalítico (conforme visto anteriormente) é reduzida às custas da forma reduzida da tioredoxina (Trx_{red}), uma proteína que também contém grupos -SH. Esta proteína então é oxidada (Trx_{ox}), gerando uma ponte dissulfeto intramolecular (STANLEY et al., 2011) (Fig. 9). A GSSG e a Trx_{ox} formadas durante a ação da GPx e da Prx, assim como através de outros processos metabólicos, devem ser constantemente recicladas dentro da célula para o funcionamento correto do sistema peroxidático. Isto é realizado por enzimas redutases auxiliares: a glutationa redutase (GR) é responsável pela redução de GSSG a GSH (Fig. 11), enquanto que a tioredoxina redutase ($TrxR$) é responsável pela redução da Trx_{ox} a Trx_{red} (Fig. 12) (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Ambas as enzimas utilizam NADPH como fonte doadora de elétrons.

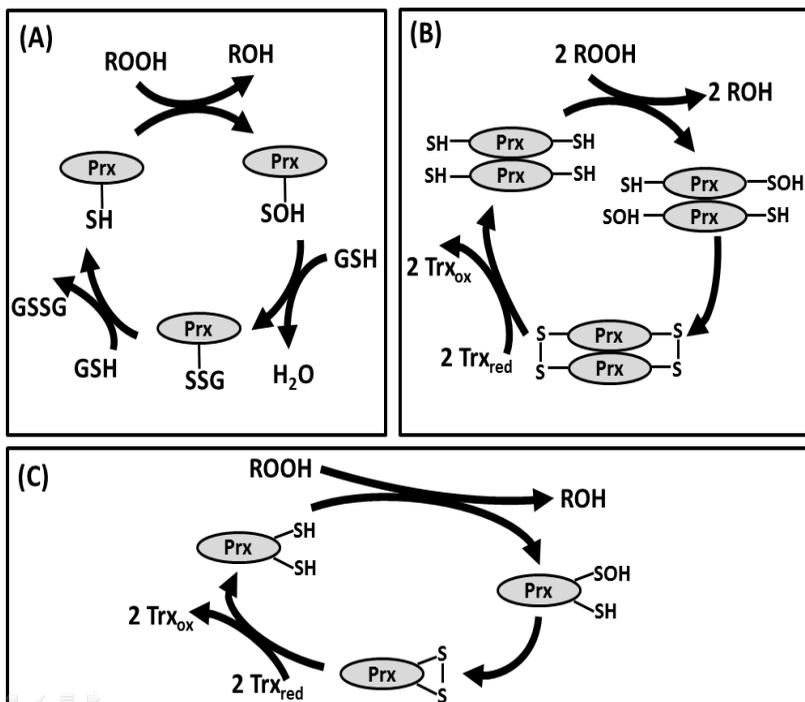


Figura 9: Ciclo catalítico das peroxirredoxinas (Prx). (A) Peroxirredoxinas contendo 1 cisteína catalítica (1Cys-Prx), (B) peroxirredoxinas típicas (2Cys-Prx), as quais são dímeros contendo uma cisteína catalítica e uma cisteína de resolução em cada uma das duas subunidades e (C) peroxirredoxinas atípicas (2Cys-Prx atípicas), as quais são monômeros contendo 2 cisteínas que participam do ciclo catalítico em uma única subunidade. Em todos os casos, uma cisteína (SH) será oxidada a ácido sulfênico (SOH) ao reduzir peróxidos (ROOH). No caso da 1Cys-Prx, o SOH gerado será reduzido utilizando glutatona (GSH) como fonte de elétrons e gerando o dissulfeto de glutatona (GSSG), num mecanismo semelhante ao da glutatona peroxidase. Para 2Cys-Prx, o SOH será reduzido por uma cisteína presente na outra subunidade, gerando uma fonte dissulfeto intermolecular. Esta ponte dissulfeto será reduzida utilizando tiorredoxina reduzida (Trx_{red}) como fonte de elétrons e gerando tiorredoxina oxidada (Trx_{ox}). Já para as 2Cys-Prx atípicas o SOH é reduzido por uma cisteína presente na mesma subunidade, gerando uma fonte dissulfeto intramolecular, a qual também será reduzida por Trx_{red}.

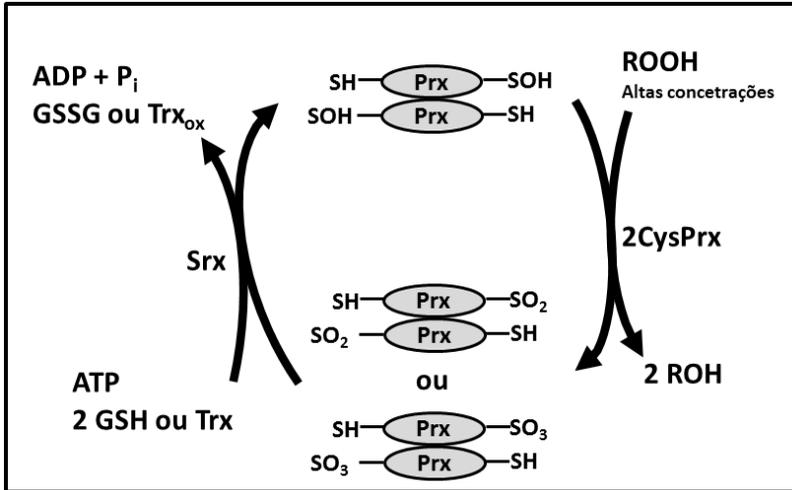


Figura 10: Superoxidação e redução das peroxirredoxinas com duas cisteínas (2Cys-Prx). Moderados níveis de peróxidos (ROOH) pode causar processos de superoxidação das 2Cys-Prx, gerando a formação de ácido sulfínico (SO₂) ou sulfônico (SO₃) nas cisteínas peroxidáticas. Essas formas de oxidação não podem ser reduzidas pelo sistema da tiorredoxina e tiorredoxina redutase, causando a inativação temporária das 2Cys-Prx. A redução das formas superoxidadas das cisteínas pode ser realizada lentamente através das sulfiredoxinas (Srx), à custa de ATP e utilizando glutatona (GSH) ou tiorredoxina (Trx) como fonte de elétrons. Prx contendo uma cisteína também podem ser superoxidadas e regeneradas pelo mesmo sistema. Modificado de Chevallet et al. (2003).

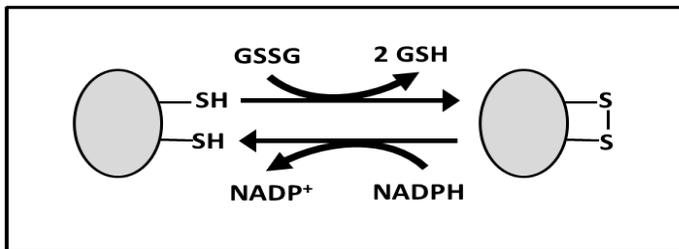


Figura 11: Ciclo catalítico da glutatona redutase (GR). A GR, por possuir dois grupos tiólicos (SH) na forma de cisteína no seu sítio ativo, é capaz de reduzir o dissulfeto de glutatona (GSSG). Inicialmente ocorre a inserção da GSSG no sítio ativo seguido do ataque covalente a um dos SH. Através de reações sequenciais, duas moléculas de GSH são liberadas com a formação de uma ponte dissulfeto (S-S) entre os SH do sítio ativo. Essa ponte dissulfeto é reduzida utilizando NADPH como fonte de elétrons.

Dados obtidos com modelos de mamíferos indicam que a GPx e Prx são as principais vias de degradação de H_2O_2 quando este está presente em níveis relativamente baixos. Apesar da cisteína catalítica da Prx e a SeCys da GPx possuírem valores semelhantes de pKa (5-6), a maior concentração celular da Prx em relação a GPx ($20 \mu M \times 2 \mu M$) permite uma taxa de reatividade aproximadamente 3 vezes maior para a Prx, sendo capaz de diminuir a capacidade de difusão do H_2O_2 em 3 ordens de magnitude (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). No caso de níveis mais elevados de H_2O_2 , como em situações patológicas, a GPx e a Cat aparentam possuir um papel mais fundamental (MUELLER; RIEDEL; STREMMEL, 1997).

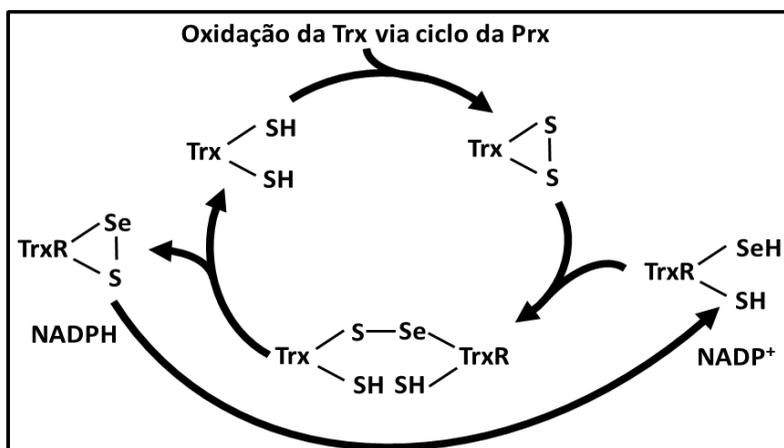


Figura 12: Ciclo catalítico da tiorredoxina redutase (TrxR). Ao ser utilizada como fonte de elétrons no ciclo catalítico das peroxirredoxinas (vide Fig. 9), a tiorredoxina (Trx) encontra-se com o grupo tiólico (SH) de suas duas cisteínas na forma de dissulfeto (S-S). A TrxR, possuindo uma selenocisteína na forma selenol (SeSH) e um SH em seu sítio catalítico, realiza a redução da S-S da Trx, gerando uma ponte sulfeto-selênio (S-Se) intermolecular. Em seguida, essa ponte é reduzida ao gerar uma ponte S-Se intramolecular na TrxR, liberando a Trx na forma reduzida. A TrxR será regenerada para sua forma reduzida utilizando NADPH como fonte de elétrons. Modificado de Berndt, Lillig e Holmgren (2007).

1.2. SISTEMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Além do sistema antioxidante, a célula também conta com outro importante sistema de proteção celular: as vias de biotransformação, responsáveis pela metabolização de substâncias endógenas e exógenas.

Através desses processos os compostos são transformados em metabólitos de maior peso molecular e de maior hidrofili­cidade, facilitando sua excreção do organismo e prevenindo sua reabsorção, consequentemente diminuindo sua toxicidade. As reações bioquímicas envolvidas nestes processos são de oxidação (incluindo hidroxilação, desaminação, desalquilação, sulfoxidação, epoxidação e desidrogenação), redução, hidrólise e conjugação. Classicamente, as vias de biotransformação são divididas em duas etapas: a fase I, contando com reações de oxidação, redução e hidrólise, e a fase II, contando com reações de conjugação (Fig. 13).

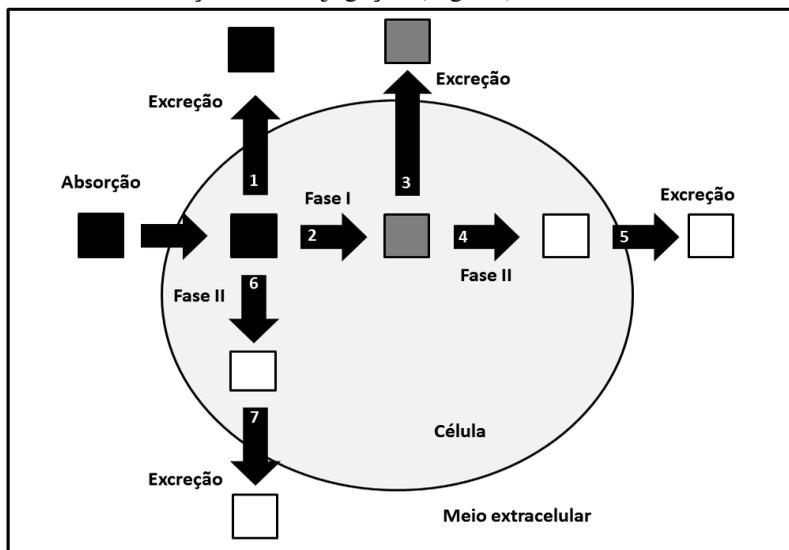


Figura 13: Processos de biotransformação de compostos exógenos. A absorção de compostos através da membrana plasmática é facilitada quando estes possuem uma alta lipofili­cidade, ocasionando o acúmulo nos tecidos. Ao ser absorvido, o composto pode ser excretado (1), ou então ser biotransformado. Através da biotransformação de fase I (2), a qual acontece por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise, ocorre a exposição de grupos funcionais reativos no composto parental, gerando um metabólito primário. Este metabólito pode ser excretado (3), ou então continuar em um processo de biotransformação de fase II (4) a partir dos grupos funcionais recém adquiridos. Ocorre então a conjugação do metabólito com moléculas endógenas, gerando um metabólito secundário de maior peso molecular e hidrofili­cidade. Este processo facilita a excreção dos metabólitos (5), evitando sua reabsorção pelo organismo. A biotransformação de fase II também pode ser realizada diretamente no composto parental (6) para posterior excreção (7), sem a necessidade de ocorrer previamente a biotransformação de fase I.

As reações de biotransformação de fase I são responsáveis por adicionar ou remover grupos funcionais nos compostos parentais, facilitando as reações de fase II. Por exemplo, grupos metila podem ser transformados em hidroximetilas ou carboxilas, podendo muitas vezes causar uma leve diminuição na sua capacidade de difusão por membranas biológicas devido a uma pequena alteração na polaridade do composto (IONESCU; CAIRA, 2005). É importante ressaltar que, apesar de participarem do processo de defesa celular, não é incomum que as reações de biotransformação de fase I gerem metabólitos reativos com maior atividade biológica e/ou toxicidade que o composto parental. Um exemplo de composto com maior atividade que o composto parental é a ampicilina, a qual é obtida a partir da metabolização da bacampicilina, pivampicilina ou talampicilina (IONESCU; CAIRA, 2005). Já no caso do analgésico acetomifeno (paracetamol), ele pode ser metabolizado para um composto de maior toxicidade (imina *N*-acetil-*p*-benzoquinona), o qual causa ligações covalentes a proteínas e depleção de GSH, podendo ser letal (JAMES; MAYEUX; HINSON, 2003).

As enzimas de biotransformação de fase I estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático e em membranas de tecidos com alta capacidade de metabolização e em contato com o meio externo, como fígado, rins, pulmões e intestino no caso de mamíferos e outros vertebrados. A alta lipofilicidade dos compostos a serem metabolizados leva ao seu direcionamento a membranas lipídicas, facilitando a atuação do sistema de biotransformação de fase I, uma vez que este também está concentrado nesta estrutura celular. Estas enzimas estão envolvidas na metabolização tanto de compostos endógenos (como hormônios, ácidos graxos, prostaglandinas e derivados) como exógenos. Dentre as principais enzimas de biotransformação de fase I, podemos citar (BOELSTERLI, 2007; LUCH, 2009):

- Sistema do citocromo P450: um dos principais sistemas de biotransformação de fase I, sendo composto por várias isoformas da hemoproteína citocromo P450 e da citocromo P450 redutase. Atuam como monoxigenases, incorporando oxigênio molecular em compostos pouco hidrofílicos.
- flavina monoxigenase: oxidação de grupos nucleofílicos contendo enxofre ou nitrogênio
- prostaglandina sintase: atividade ciclooxigenase e peroxidase na transformação de ácido aracdônico em prostaglandina H₂. Também pode atuar oxidando compostos exógenos para

utilizá-los como doadores de elétrons no metabolismo do ácido aracdônico.

- Monoamina oxidase: desaminação de aminas primárias por reações de oxidação.
- Epóxido hidrolase: hidrólise de epóxidos e formação de dihidrodióis.

As reações de biotransformação de fase II são responsáveis pela conjugação de compostos parentais ou metabólitos a compostos endógenos através de um ou mais grupos funcionais, aumentando seu tamanho e polaridade, e conseqüentemente facilitando sua excreção (no caso de mamíferos, principalmente pela urina). Como característica geral, essa conjugação realiza a troca de um átomo de hidrogênio presente em um grupo hidroxila, amina ou carboxila pelo composto endógeno. As principais reações de fase II são (BOELSTERLI, 2007; LUCH, 2009):

- Glucuronidação: principal rota de conjugação de açúcares, na qual uma molécula de ácido glucurônico (obtida a partir de uridina-5'-difosfato-ácido glucurônico) é conjugada ao substrato pela ação da UDP-glucuroniltransferase. Estas enzimas estão presentes no retículo endoplasmático liso e atuam rapidamente na neutralização de metabólitos derivados da ação do citocromo P450.
- Sulfatação: importante via de conjugação de fenóis, álcoois, aminas e tióis. Inicialmente ocorre a transformação de um sulfato inorgânico para sua forma ativa 3'-fosfoadenosina-5'fosfosulfato. Em seguida, sulfotransferases são responsáveis pela transferência do grupo sulfúril desta molécula para uma molécula aceptora.
- Acetilação: transferência do grupo acetil da acetil-coenzima A para grupos aromáticos, aminas alifáticas, aminoácidos, hidrazinas e sulfonamidas pelas enzimas N-acetiltransferases. A acetil-coenzima A é obtida principalmente da glicólise ou então do catabolismo de ácidos graxos e aminoácidos.
- Metilação: adição de grupos metilas obtidos a partir de S-adenosilmetionina. Esta é obtida através da ligação entre metionina e do ATP, a qual irá posteriormente transferir o grupo metila para diferentes tipos de substratos através de metiltransferases.
- Conjugação com GSH: transferência de GSH a compostos eletrofílicos através de uma ligação tioéster. A família de

enzimas responsável pela conjugação de GSH a agentes eletrofilicos é a glutatona S-transferase (GST). Através desse processo é possível prevenir que estes compostos ataquem centros nucleofílicos de biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Os conjugados de glutatona são posteriormente metabolizados pela via do ácido mercaptúrico para então, no caso de mamíferos, serem excretados via urina ou bile (Fig. 14).

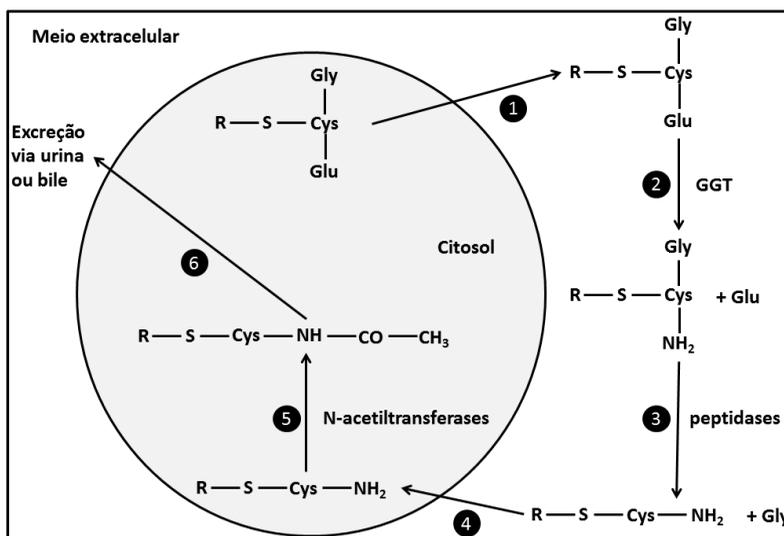


Figura 14: Esquema representando a via do ácido mercaptúrico. (1) Conjugados de glutatona (R-S-[Gly-Cys-Glu]), obtidos principalmente através da biotransformação de fase II mediada pela enzima glutatona S-transferase, são transportados para fora da célula a partir de transportadores específicos do tipo ABC (do inglês *ATP-binding cassette*). (2) Esses conjugados são metabolizados pela enzima gamma-glutamil transpeptidase (GGT), a qual se encontra no lado exterior da membrana plasmática das células e realiza a liberação ou transferência do grupo gamma-glutamil (Glu), gerando um conjugado de cisteína-glicina (R-S-[Gly-Cys-NH₂]). (3) Este metabólito sofre ação de peptidases extracelulares, as quais quebram a ligação cisteína-glicina, liberando glicina (Gly) e formando um conjugado de cisteína (R-S-Cys-NH₂). (4) Este conjugado é transportado para o interior da célula (podendo ser uma célula de outro tecido), onde (5) sofrerá ação de N-acetiltransferases para a inserção de um grupo acetil a partir de uma acetil coenzima A. O novo conjugado, N-acetilcisteína (R-S-Cys-NH-CO-CH₃), com maior peso molecular e hidrofílicidade, é então excretado pela bile ou principalmente pela urina, no caso de mamíferos.

Grande parte dessa informação a respeito dos sistemas antioxidante e de biotransformação é obtida a partir de estudos com organismos modelos clássicos, como mamíferos (principalmente com roedores e com cultura de células) ou mesmo microrganismos como levedura. Entretanto, estes sistemas estão presentes de forma ubíquota entre os seres vivos, possivelmente com diferentes modificações.

O presente trabalho investiga o funcionamento destes sistemas de defesas celulares em bivalves marinhos. Entretanto, estes animais não são utilizados como clássicos modelos para estudos bioquímicos e toxicológicos, mas estão expostos a diversos compostos químicos no ambiente, muitas vezes originados a partir de ações humanas. Desta forma, o funcionamento de seus sistemas de defesas está intimamente relacionado à sobrevivência desses organismos no ambiente. Estudos desses sistemas à nível molecular, bioquímico e fisiológico em bivalves, assim como em outros invertebrados, pode ser um desafio. Isto porque estes organismos possuem características bem distintas com relação a mamíferos e outros vertebrados (GOSLING, 2003), como morfologia, metabolismo aeróbio facultativo, sistema circulatório aberto, ausência de pigmento respiratório (como a hemoglobina), termoconformação, hábito geralmente sésil, baixa taxa metabólica, alimentação por filtração, ausência de sistema imunológico adaptativo, além da baixa disponibilidade de informações e ferramentas a nível molecular (*e. g.* transcriptomas, genomas, sequências de genes de interesse, anticorpos comerciais, proteínas purificadas). Dessa forma, este trabalho visa auxiliar na caracterização do papel protetor de sistemas de defesas celulares em bivalves. Apesar de não serem usados como modelos para estudos toxicológicos, estes organismos podem ser utilizados como importantes modelos para estudos de contaminação ambiental, conforme discutido a seguir.

1.3. O ESTUDO DOS SISTEMAS DE DEFESAS CELULARES EM BIVALVES NA ECOTOXICOLOGIA

Nas últimas décadas o interesse científico nas áreas de toxicologia ambiental e ecotoxicologia têm aumentado em consequência dos problemas ecológicos que estamos enfrentando. Alterações climáticas, crescimento populacional, demanda por água potável e poluição são alguns dos problemas que afetam o meio ambiente, em particular os ecossistemas aquáticos. Dentre estes problemas merece destaque a contaminação ambiental, a qual pode causar problemas diretos na saúde humana, em atividades econômicas (como pesca e turismo) e na biota local.

Como uma resposta a esse cenário, a ecotoxicologia aparece como uma ciência interessada nos efeitos de contaminantes naturais e sintéticos nos seres vivos. O uso de abordagens integradas são características de estudos ecotoxicológicos (TRUHAUT, 1977). Biomarcadores são comumente utilizados para estudar as consequências e respostas biológicas induzidas por contaminantes. Na ecotoxicologia, o termo biomarcador pode ser classificado como *“uma alteração na resposta biológica, desde o nível molecular, passando pelo celular, fisiológico e comportamental, que pode estar relacionado com a exposição ou efeitos tóxicos de compostos químicos ambientais”* (PEAKALL, 1994). A detecção precoce de alterações nos organismos, através do uso de biomarcadores, é uma importante ferramenta avaliativa que tem como finalidade evitar perturbações mais severas, tais como as ecológicas, as quais afetam diretamente populações e ecossistemas. Em geral, os efeitos ecológicos são irreversíveis ou de difícil recuperação, daí a importância preventiva do uso de biomarcadores.

Diferentes organismos podem ser utilizados em estudos ecotoxicológicos, como procaríotos, algas, invertebrados e vertebrados. Dentre os modelos utilizados, destacam-se os bivalves, como mexilhões e ostras, os quais são amplamente utilizados em trabalhos de monitoramento ambiental por algumas características-chaves: ampla distribuição geográfica, elevada importância econômica, além de serem organismos sésseis e filtradores, de fácil manutenção em laboratório e com grande capacidade de bioacumulação de compostos ao longo do tempo (APETI et al., 2010; DEPLEDGE; FOSSI, 1994). Além disso, a utilização de bivalves em estudos ecotoxicológicos pode fornecer respostas importantes, uma vez que invertebrados representam cerca de 95% das espécies de animais do planeta, possuem importantes funções ecológicas e também representam uma importante via de transferência de xenobióticos ao longo da cadeia trófica (BAUN et al., 2008). O programa “Mussel Watch” é um exemplo do uso de mexilhões e ostras em um monitoramento nacional de ampla escala dos níveis de contaminantes ambientais em sistemas costeiros e estuários nos EUA (APETI et al., 2010).

Efluentes aquáticos podem conter diferentes classes de contaminantes, sendo que muitos deles capazes de causar efeitos tóxicos nos organismos (WINSTON; DI GIULIO, 1991), como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), bifenilas policloradas, metais, fármacos e pesticidas. Dessa forma, a quantificação dos danos oxidativos e da resposta dos sistemas de defesa de organismos aquáticos

contra diferentes contaminantes pode ser utilizada como biomarcadores de contaminação aquática (COSSU et al., 2000; REGOLI; PRINCIPATO, 1995; REGOLI et al., 2002), fornecendo informações adicionais sobre as condições bioquímicas e fisiológicas dos organismos. Dentre os principais tipos de contaminantes ambientais estudados com bivalves, destacam-se os HPA, metais, pesticidas e compostos emergentes, os quais são brevemente discutidos a seguir.

HPA é uma classe de substâncias orgânicas com estrutura planar contendo mais de um anel aromático. Eles são contaminantes derivados de combustíveis fósseis, demonstrando atividade carcinogênica, mutagênica e teratogênica tanto em humanos quanto em outros organismos expostos a estes compostos (BAIRD; HOOVEN; MAHADEVAN, 2005; HYLLAND, 2006). Por serem substâncias com alta persistência no meio ambiente, bivalves e outros organismos com hábito de filtração podem ser considerados como alvos primários de HPA, os quais podem posteriormente atingir níveis extremamente elevados em outros organismos através da cadeia trófica (MANZETTI, 2012). É importante observar que a baixa atividade dos citocromos P450 (responsável pelo metabolismo inicial de HPA) em bivalves (em comparação a vertebrados) pode acarretar numa menor taxa de metabolismo e excreção de HPA nestes organismos, ocasionando a sua bioacumulação (STEGEMAN; LECH, 1991). O principal órgão de acumulação de HPA em bivalves é a glândula digestiva, enquanto que os lisossomos são comumente os principais alvos celulares (NEFF, 2002).

Com relação aos metais, alguns metais-traço são importantes elementos do metabolismo celular, como Fe, Cu, Zn, Mg, participando da estrutura e catálise de proteínas e possuindo papéis fisiológicos como regulação da osmolaridade celular, transmissão neuronal e sinalização. Enquanto isso, outros metais como Pb, Cd, Cr são considerados xenobióticos por não se conhecerem funções biológicas associadas a estes compostos. Tanto metais que são importantes para o metabolismo celular como aqueles considerados xenobióticos podem causar distúrbios celulares e fisiológicos, quando em níveis elevados. Parte desses efeitos deletérios está associada à geração de ERO. Assim como no caso de HPA, os bivalves apresentam uma alta capacidade de bioacumular metais, permitindo que sejam utilizados como organismos alvos para estudos ambientais. Entretanto, o processo de bioacumulação pode ser extremamente variável entre as espécies, sendo necessário realizar análises adicionais com outros biomarcadores a fim de determinar os níveis de contaminação desses ambientes (ZUYKOV;

PELLETIER; HARPER, 2013). A glândula digestiva é apontada como um órgão alvo para bioacumulação de metais em bivalves, principalmente a nível lisossomal, apesar da brânquia e até mesmo a concha terem demonstrado potencial bioacumulação (GUPTA; SINGH, 2011; ZUYKOV; PELLETIER; HARPER, 2013). A nível celular, os metais podem se acumular em organelas (e.g. lisossomos), proteínas (e.g. metalotioneínas) e grânulos, gerando “pools” biologicamente ativos ou inativos (WANG, 2013).

Os pesticidas se caracterizam como uma classe de substâncias orgânicas utilizadas em atividades de controle de pragas, a fim de controlar organismos que possam causar danos a plantações, animais ou seres humanos. Muitos pesticidas são substâncias persistentes no meio ambiente, algumas vezes por décadas sem sua completa degradação ou dispersão. Desta forma, pesticidas colocam em grande risco os ecossistemas aquáticos devido a sua toxicidade e a sua permanência prolongada no ambiente. Em geral, organismos não alvos expostos a pesticidas apresentam distúrbios imunológicos, reprodutivos, inibição de colinesterases e estresse oxidativo (ANGUIANO et al., 2010; BOUILLY et al., 2007; GAGNAIRE et al., 2007; GRIFFITT et al., 2006). Muitos estudos ecotoxicológicos são relacionados aos efeitos tóxicos de pesticidas em vertebrados como peixes e anfíbios, enquanto para bivalves as informações disponíveis são mais limitadas.

Uma nova classe de contaminantes ambientais tem sido estudada recentemente, chamada de compostos emergentes. Diversas substâncias vêm sendo descobertas em ambientes aquáticos sem que sua toxicidade tenha sido previamente estudada, além de muitas vezes serem detectadas em concentrações acima das esperadas. Desta forma, apesar dos poucos estudos nesta área, é evidente o potencial tóxico desses compostos emergentes, mas seus riscos para o ser humano e ao meio ambiente ainda são desconhecidos. Entre eles podemos citar os éteres difenílicos polibrominados, produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, hormônios sintéticos, compostos perfluorinados e nanopartículas (HALDEN, 2010). Com o objetivo de diminuir esta lacuna no conhecimento, trabalhos em laboratório vêm sendo desenvolvidos a fim de investigar os efeitos desta nova classe de contaminantes em bivalves.

Diversos trabalhos de campo ao redor do planeta já indentificaram alterações nos sistemas de defesas antioxidante e de biotransformação em bivalves sob influência dessas diferentes classes de contaminantes ambientais. Com relação aos HPA, é comum detectar um aumento nesses sistemas em animais de regiões contaminadas, como no caso de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* na Coreia do Sul e em mexilhões

Dreissena polymorpha e *Mytilus edulis* (ROCHER et al., 2006; NAMIESNIK et al., 2008). Este mesmo padrão pode ser evidenciado em áreas sob efeito de derramamento de petróleo causados por acidentes ambientais: (i) maior atividade da Cat, SOD, GPx, TrxR, GST e citocromo P450, em conjunto com elevados níveis de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e HPA foram detectados em mexilhões *M. galloprovincialis* após o derramamento de petróleo causado pelo petroleiro Don Pedro em 2007, na Espanha (SUREDA et al., 2011); (ii) maior atividade da SOD, citocromo P450, GST, GPx e elevados índices de peroxidação lipídica foram detectados em berbigões *Mya arenaria* e mexilhões *Mytilus trossulus* em regiões sob influência do derramamento causado pelo petroleiro Exxon Valdez em 1989, no Alasca (DOWNS et al., 2002).

No caso de regiões contaminadas por metais, também é comum detectar alterações em parâmetros relacionados ao sistema antioxidante e acúmulo de danos oxidativos. Por exemplo, mexilhões *M. galloprovincialis* apresentaram elevada atividade da SOD, Cat e maiores níveis de peroxidação lipídica em (VLAHOGIANNI et al., 2007) em regiões contaminadas com metais na Grécia. Na Espanha, um estudo com mexilhões *M. galloprovincialis* e ostras *Crassostrea angulata* de regiões impactadas por zinco e cobre apontou para maiores atividades da Cat, SOD, GPx e GST nas ostras. Este maior nível de defesas celulares esteve correlacionado aos menores níveis de dano ao DNA e peroxidação lipídica nas ostras, quando comparado com os mexilhões das mesmas áreas de estudo (FUNES et al., 2006). Na China, berbigões *Ruditapes philippinarum* transplantados para regiões impactadas por metais apresentaram alterações na atividade das enzimas Cat, SOD, GPx e GST (WANG et al., 2012b).

Os efeitos de pesticidas já foram analisados em bivalves expostos *in situ* a estes compostos. Berbigões *Corbicula fluminea* transplantados para áreas sob influência de efluentes agrícolas (contaminados por herbicidas, triazinas, organofosforados, propanil e molinato) apresentaram elevada mortalidade e peroxidação lipídica. Menor atividade enzimática da GST, Cat e GPx também foi detectada nesses animais (DAMÁSIO et al., 2010). Inibição de esterases, um clássico biomarcador de contaminação por organofosforados, foi detectada em mexilhões *M. galloprovincialis* residentes em áreas próximas à atividade de agricultura. Menor taxa de filtração e de respiração, assim como menor atividade GPx também foram detectadas nestes organismos (TSANGARIS et al., 2010).

Os efeitos desses diferentes tipos de contaminantes ambientais sobre os sistemas de defesas celulares também foi bem caracterizado através de estudos em laboratório. Uma resposta de amplificação das defesas antioxidantes e de biotransformação já foi caracterizada, por exemplo, em bivalves expostos a HPA, metais ou compostos emergentes, com aumento nos níveis de GSH, maior atividade da GPx, GR, GST, SOD, gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) ou glioxalase, assim como um aumento nos transcritos de GST, metiltransferase e de citocromo P450 (CHEUNG et al., 2004; ANTOGNELLI et al., 2006; FRANCO et al., 2006; LÜCHMANN et al., 2011; SABATINI et al., 2011b ; GONG et al., 2012; GONZALEZ-REY; BEBIANNO, 2012; GONZALEZ-REY; BEBIANNO, 2013; LÜCHMANN et al., 2014; TREVISAN et al., 2014). Inibições de enzimas antioxidantes também já foram reportadas em bivalves, principalmente durante exposição a metais, aumentando a susceptibilidade ao estresse oxidativo. Como exemplo, podemos citar a inibição da GR por zinco em mexilhões *P. perna* (FRANCO et al., 2006), da TrxR por cobre em mexilhões *M. edulis* (TREVISAN et al., 2011) e da GPx por mercúrio, também em *M. edulis* (CHATZIARGYRIOU; DAILIANIS, 2010).

A quantificação de danos em macromoléculas é um dos parâmetros mais estudados em trabalhos de laboratório com contaminantes ambientais e bivalves. Essa quantificação também é bem caracterizada em bivalves expostos a HPA, metais, pesticidas e compostos emergentes, indicando consumo de GSH, peroxidação lipídica, ubiquitinação e carbonilação de proteínas; oxidação de SH proteicos, danos ao DNA, diminuição na relação GSH/GSSG e distúrbios celulares (PEÑA-LLOPIS; FERRANDO; PEÑA, 2002; VERLECAR; JENA; CHAINY, 2007; TRAN et al., 2007; CHORA et al., 2009; HANNAM et al., 2010; TREVISAN et al., 2011; GUST et al., 2012; GONZALEZ-REY; BEBIANNO, 2012; GONZALEZ-REY; BEBIANNO, 2013; PEDRIALI et al., 2013);

Conforme observado, a ativação do sistema de biotransformação de fase I e II é uma resposta comum em animais expostos a HPA, pesticidas e compostos emergentes a fim de permitir a biotransformação e excreção desses compostos. Entretanto, o aumento na atividade da GST e do citocromo P450 pode ocasionar num aumento a produção de ERO e consumo de GSH, aumentando a susceptibilidade dos organismos ao estresse oxidativo. Metais, em geral, também possuem essa capacidade de agirem como compostos oxidantes, aumentando a produção intracelular de ERO, ocasionando danos em macromoléculas. A inibição de enzimas de proteção celular também pode ser considerada

como um importante fator de toxicidade de metais, afetando diretamente sua toxicidade. Estes danos podem causar distúrbios celulares, com perda da viabilidade celular e indução de eventos pro-apoptóticos.

O aumento na produção de ERO, muitas vezes induzido pela exposição à contaminantes ambientais, pode ativar vias específicas de sinalização celular que podem facilitar a sobrevivência da célula, como amplificação do sistema antioxidante (*e. g.* via do Nrf2, vide Fig. 3), síntese de metalotioneínas, proteínas relacionadas ao transporte de metais e chaperonas. Em mamíferos, ERO podem ativar receptores de fatores de crescimento celular, proteínas tirosina cinase, proteína Ras, proteíno-cinases ativadas por mitógenos e fatores de transcrição nuclear (LEONARD; HARRIS; SHI, 2004). Conforme já comentado, a modulação dessas vias de sinalização pode ativar ou inibir respostas celulares específicas como amplificação do sistema antioxidante e indução de proteínas relacionadas a apoptose e a estresse celular. Entretanto, estes processos ainda são pouco conhecidos em bivalves. A maior atividade de enzimas antioxidantes em animais expostos à diferentes classes de contaminantes, detectada tanto em trabalho de campo como em laboratório, aponta para uma possível resposta adaptativa à situações de estresse a fim de evitar o acúmulo de dano e distúrbios celulares.

1.3.1. Nanomateriais

Uma vez que este trabalho estudou os efeitos de nanopartículas de óxido de zinco em ostras, esta subseção abordará de maneira mais específica os nanomateriais. Estas substâncias são compostos emergentes de interesse produzidos pela indústria mundial com diferentes propósitos comerciais. De acordo com a Comissão Européia (2011), estes compostos são classificados como “um material natural, produzido acidentalmente ou fabricado que contém partículas soltas, agregadas ou aglomeradas, no qual 50% ou mais das partículas apresentam, na distribuição granulométrica, uma ou mais dimensões externas no intervalo 1 nm – 100 nm”. Em situações específicas, as quais estejam preocupadas com os efeitos na saúde e meio ambiente, esta frequência do tamanho de partículas pode diminuir de 50% para valores entre 1 e 50%. Apesar de aglobar diversos compostos nesta categoria, eles podem possuir características químicas e físicas bem distintas, desde tamanho, área de superfície, solubilidade, estrutura e forma (NEL et al., 2006).

Segundo dados da Web of Science® (maio de 2014), até o presente mais de 23.000 trabalhos (incluindo patentes) já foram

publicados à respeito de nanomateriais (*nanomaterials*), porém apenas cerca de 2.700 trabalhos estudaram os efeitos tóxicos (*toxicity*) desses compostos em seres vivos. Destes, somente 17 foram estudos em bivalves (*bivalve*, *oyster*, *mussel*, ou *clam*). Estes dados demonstram a falta de conhecimento a respeito dos efeitos adversos das nanomateriais, tanto para o ser humano como para o meio ambiente. Até o presente momento, não existem legislações ambientais específicas para o uso e descarte de nanomateriais no meio ambiente, tanto no Brasil como nos demais países, reforçando a ideia da falta de conhecimento quanto aos efeitos dessas substâncias nos ecossistemas.

Os efeitos tóxicos de nanomateriais estão relacionados com seu pequeno tamanho e grande superfície, expondo os organismos à uma maior quantidade de átomos ou moléculas num mesmo ponto de exposição, aumentando sua reatividade. Frequentemente, a toxicidade de nanomateriais de metais está associada a 3 mecanismos principais: (I) liberação de compostos tóxicos no meio de exposição, como no caso de nanopartículas de zinco e prata liberam suas respectivas formas iônicas (Zn^{2+} e Ag^+) no meio aquoso; (II) interação da superfície da nanopartícula com o meio produzindo substâncias tóxicas, como radicais químicos e ERO; (III) interação da superfície das nanomateriais com biomoléculas, como membranas e DNA (BRUNNER et al., 2006).

Até então, os estudos de nanomateriais envolvendo organismos aquáticos já foram realizados com bactérias, algas, invertebrados e peixes, apesar de ainda serem limitados em número. Porém, estudos com nanopartículas metálicas com bivalves estão ficando mais frequentes na área de ecotoxicologia. Nanopartículas de prata foram caracterizadas como tóxicas para o desenvolvimento de embriões da ostra *Crassostrea virginica* (RINGWOOD et al., 2010) e causam distúrbios nos processos de calcificação da concha de mexilhões *M. edulis* (ZUYKOV et al., 2011). Nanopartículas de cobre estão relacionadas a processos oxidativos em brânquias (GOMES et al., 2011) e glândula digestiva (GOMES et al., 2012) de mexilhões *M. galloprovincialis*, além de causarem distúrbios comportamentais no berbigão *Scrobicularia plana* (BUFFET et al., 2011). Nanopartículas de ouro também têm sido consideradas como agentes oxidantes. Em mexilhões *M. edulis*, elas causam distúrbios na integridade da membrana lisossomal, oxidação de tióis de proteínas, peroxidação lipídica e alterações redox na glândula digestiva (TEDESCO et al., 2010a, 2010b), além de distúrbios comportamentais em berbigões *S. plana* (PAN et al., 2012). Os dados reforçam a ideia de que nanomateriais são substâncias tóxicas para bivalves, através da geração

de ERO que consequentemente levam a um aumento nos danos em macromoléculas.

No presente trabalho, a fim de investigar os efeitos de um contaminante ambiental com capacidade oxidante na homeostase celular de bivalves, nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) foram utilizadas em experimentos com ostras *Crassostrea gigas*. Este nanomaterial é utilizado em produtos como plástico, cerâmica, vidro, cimento, borracha, lubrificantes, tintas, pigmentos, comida, baterias, cosméticos, e protetores solares. Durante a sua produção, utilização ou descarte, as ZnONP podem chegar a ambientes aquáticos. Até o presente momento, já foi detectada a presença dessas nanopartículas com valores na ordem de 0,01 µg/L em águas de superfície, 2 µg/Kg em sedimentos e 20 µg/L em efluentes não tratados, porém os estudos acerca dos efeitos nocivos desses materiais em organismos aquáticos ainda é bastante limitado (MA; WILLIAMS; DIAMOND, 2013).

Inúmeras evidências apoiam a ideia de indução de estresse oxidativo por ZnONP em diferentes células e organismos modelos, especialmente em mamíferos. Em camundongos, sua administração oral causou aumento na peroxidação lipídica, danos oxidativos no DNA e lesões patológicas no fígado e rim (SHARMA et al., 2012). Em ratos, exposição a ZnONP causou distúrbios no metabolismo energético e no funcionamento mitocondrial nos rins, o que pode estar relacionado a sua nefrotoxicidade (YAN et al., 2012). Já culturas de células de mamíferos expostas a ZnONP apresentaram distúrbios mitocondriais, aumento na produção de ERO, diminuição no conteúdo de ATP e necrose, aumento na expressão de enzimas de proteção celular, ativação de vias pró-inflamatórias e liberação de Ca^{2+} (XIA et al., 2008; ZHANG et al., 2012). Este mesmo padrão de indução de estresse oxidativo e citotoxicidade foi detectado em *Escherichia coli* expostas a ZnONP. A incorporação de nanopartículas causou um aumento na produção de ERO, levando a peroxidação lipídica, consumo de GSH e dano oxidativo ao DNA, processos relacionados com genotoxicidade e morte celular (KUMAR et al., 2011).

Entretanto, com relação a bivalves, apesar do crescente aumento nas evidências dos efeitos tóxicos de nanomateriais nestes organismos (CANESI et al., 2012), as informações disponíveis à respeito de sua toxicidade ainda são limitadas. Os efeitos *in vitro* dessas nanopartículas foram estudados em hemócitos da ostra *C. gigas* (CIACCI et al., 2012). Elas causaram distúrbios na membrana lisossomal e diminuição na capacidade fagocítica dos hemócitos, aumento na produção de ERO, distúrbios mitocondriais e eventos apoptóticos. Recentemente foi

indicado que mexilhões podem ser extremamente eficientes em filtrar ZnONP em suspensão, com posterior excreção por pseudofeces mesmo acumulando uma grande parte nos tecidos (MONTES et al., 2012). Acumulação de zinco, aumento na taxa de respiração, menor taxa de crescimento e maior mortalidade foram observadas em mexilhões expostos a ZnONP, indicando uma alta demanda energética para lidar com o excesso de zinco (HANNA et al., 2013). Estes dados estão de acordo com o aumento na peroxidação lipídica e nos níveis de metalotioneínas também encontrado em mexilhões (GAGNÉ et al., 2013) ou com distúrbios comportamentais e aumento na atividade da Cat em berbigões expostos a ZnONP (BUFFET et al., 2012). Maiores taxas de respiração, acúmulo de zinco, aumento nos níveis de metalotioneínas, peroxidação lipídica e na atividade SOD já foram detectados em outros bivalves expostos a este nanomaterial (BUFFET et al., 2012; GAGNÉ et al., 2013; HANNA et al., 2013), porém sem muito enfoque no sistema antioxidante. Dessa forma, a caracterização dos efeitos de ZnONP neste sistema de defesa e na capacidade de ZnONP induzirem danos oxidativos e disfunção celular é fundamental para melhor compreender sua interação nestes organismos.

1.4. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA UTILIZADAS

A seguir estão descritos os princípios teóricos dos diferentes estudos realizados neste trabalho.

1.4.1. Investigação do processo de biotransformação de fase II e da via do ácido mercaptúrico em bivalves

Este trabalho também visou investigar o papel de diferentes tecidos (brânquia, glândula digestiva e hemolinfa) nos processos de biotransformação do CDNB. Este composto é utilizado rotineiramente como substrato universal para o ensaio de atividade enzimática da GST, sendo substrato para isoformas de várias famílias de GST (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Conforme apresentado na seção 1.2 (vide Fig. 14), após o processo de conjugação de compostos eletrofílicos com GSH via GST, ocorre a metabolização da via do ácido mercaptúrico. Em mamíferos (REBBEOR et al., 1998; STOELTING; TJEERDEMA, 2000; VAIDYA; VILLANUEVA et al., 2006; GERK, 2007), estes conjugados de glutathione (DNP-SG ou 2,4-dinitrofenil-glutathione, no caso do CDNB) são excretados para fora das células hepáticas, onde peptidases extracelulares, geralmente nos rins, são responsáveis pela remoção dos resíduos γ -glutamil e a glicina, gerando um conjugado de cisteína (DNP-CYS ou 2,4-dinitrofenil-cisteína, no

caso do CDNB). Em seguida, esses metabólitos são absorvidos pelas células hepáticas, onde serão acetilados, gerando conjugados de N-acetilcisteína (DNP-NAC ou 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína, no caso do CDNB). Estes produtos finais são conhecidos como ácidos mercaptúricos, os quais serão, então, a principal forma excretada pelo organismo através da urina e das fezes, uma vez que o fígado lança os ácidos mercaptúricos no ductos biliares ou os rins liberam estes compostos via urina. Entretanto, a rota do ácido mercaptúrico não é descrita para bivalves.

Sendo assim, através da exposição de organismos ou culturas celulares ao CDNB, é possível acompanhar os processos de biotransformação de fase II e da via do ácido mercaptúrico, conforme já documentado com porcos da índia, ratos, camundongos e células de humanos. Utilizando este composto pode-se seguir: (a) absorção de compostos eletrofílicos; (b) sua conjugação com GSH; (c) seu exporção para fora da célula seguido da retirada dos resíduos de gamma-glutamato e glicina; (d) recaptação celular com síntese de um ácido mercaptúrico; e (e) sua excreção via urina ou bile (REBBEOR et al., 1998; STOELTING; TJEERDEMA, 2000; VAIDYA; GERK, 2007). A caracterização dos processos de transporte de conjugados de glutathione também já foi realizada em rins e intestino de mamíferos utilizando o CDNB como composto modelo (VILLANUEVA et al., 2006).

Inúmeros trabalhos de campo e de laboratório estão relacionados à exposição de bivalves a diversos contaminantes orgânicos (conforme abordado na seção 1.4), muitos dos quais podem sofrer processos de conjugação com GSH pela via de biotransformação de fase II. Porém, ainda não foi investigado o funcionamento desta via em bivalves marinhos. Desta forma, através de uma exposição ao CDNB em conjunto com técnicas de cromatografia líquida de alta performance, foi realizada a identificação e quantificação de CDNB e metabólitos da via do ácido mercaptúrico na água do mar e nos tecidos de ostras (brânquia, glândula digestiva e hemolinfa) ao longo da exposição. Sabendo que o CDNB é um substrato da GST, a quantificação dos níveis de GSH, da atividade da GST e da expressão gênica de três isoformas dessa enzima na brânquia e glândula digestiva permitiu analisar a modulação do sistema de biotransformação de fase II em ostras. O sistema antioxidante também foi analisado, uma vez que a GSH é utilizada na biotransformação do CDNB, além deste composto já ter sido caracterizado como inibidor das enzimas antioxidantes GR e TrxR em mamíferos (BILZER et al., 1984; HEISS; GERHÄUSER, 2005; SEYFRIED; WÜLLNER, 2007).

Dessa forma, o consumo de GSH, modulação da atividade e expressão gênica da GST, assim como a inibição da GR e TrxR podem ser usados como ferramentas para estimar o aporte e a influência do CDNB nos diferentes tecidos analisados. Além disso, o agente eletrofílico N-etilmaleimida (NEM) foi utilizado como depletor de GSH a fim de bloquear a capacidade de biotransformação do CDNB nos tecidos. Por último, o consumo de GSH e a modulação da atividade das enzimas GST, GR e TrxR foi analisado em animais expostos a CDNB ou NEM pela água do mar ou pela hemolinfa, a fim de compreender o papel da brânquia como ponto de entrada e da metabolização inicial de substâncias eletrofílicas nestes organismos.

1.4.2. Inibição do sistema antioxidante e o uso de agentes oxidantes

No presente trabalho o papel das defesas antioxidantes na proteção celular foi investigado em mexilhões *Perna perna* e ostras *C. gigas* expostos a agentes oxidantes. Em um trabalho anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, foi detectado que zinco é capaz de inibir a enzima GR após uma exposição aguda em mexilhões *P. perna* (FRANCO et al., 2006). Da mesma maneira, foi observado que o composto eletrofílico 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é capaz de inibir a TrxR *in vitro* em cultura de células de mamíferos (HEISS; GERHÄUSER, 2005; SEYFRIED; WÜLLNER, 2007). Tendo em vista que os sistemas da GPx e da Prx dependem da ação complementar da GR e TrxR para o funcionamento de seus ciclos catalíticos (Fig. 8 e 9), no presente trabalho mexilhões, *P. perna* foram expostos a zinco e CDNB enquanto que ostras *C. gigas* foram expostas apenas a CDNB como uma ferramenta para avaliar a capacidade de detoxificação de peróxidos. Sendo assim, foi estimado o papel dos sistemas enzimáticos dessas duas peroxidases na sobrevivência animal, detoxificação e proteção celular utilizando o hidroperóxido de cumeno (CHP) ou a quinona menadiona (Men) como agentes oxidantes.

Já foi demonstrada a toxicidade do CHP em diferentes modelos de mamíferos, através de processos de estresse oxidativo e dano celular. Por exemplo, no caso de células de mamíferos, o CHP induziu danos no DNA, perda de viabilidade ou morte celular, distúrbio mitocondrial e energético, diminuição de GSH e danos oxidativos em macromoléculas (BARZEGAR; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2011; MITOZO et al., 2011; POURAHMAD et al., 2010; VIMARD et al., 2011). Entretanto, não foram encontrados estudos com CHP em bivalves, exceto por um trabalho de enzimologia caracterizando a atividade GPx na glândula

digestiva de mexilhões *M. edulis* (LIVINGSTONE et al., 1992). Outro peróxido orgânico (hidroperóxido de tert-butila) já foi utilizado como agente oxidante a fim de investigar a relação entre a eficiência do sistema antioxidante e a extrema longevidade de alguns bivalves (> 60 anos), porém apenas através de ensaios de apoptose e mortalidade (RIDGWAY et al., 2014; UNGVARI et al., 2011, 2013a, 2013b). Aparentemente, nestas espécies de maior longevidade, uma maior eficiência do sistema de defesa antioxidante não era a única ou principal regra capaz de garantir essa maior sobrevivência aos longos dos anos.

Além da selenoenzima GPx e da 1Cys-Prx, a GST também possui atividade do tipo GPx contra peróxidos orgânicos, utilizando GSH como fonte de elétrons. As isoformas da GST estão localizadas tanto no citosol como na mitocôndria e em microssomas (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; LAWRENCE; BURK, 1976). Além disso, as 2Cys Prx também atuam degradando CHP, porém utilizando Trx como fonte de elétrons. Dessa forma, ao utilizar CHP como substrato não é possível identificar qual dessas diferentes famílias de enzimas (GPx, GST e Prx) estaria atuando majoritariamente na detoxificação do mesmo, sendo então uma medida geral de atividade do tipo peroxidase de hidroperóxidos orgânicos.

No caso da Men, ela foi utilizada como modelo de oxidante devido ao processo de biotransformação de quinonas. Ele pode ocorrer inicialmente por sua redução através de duas vias (Fig. 15): (i) uma de menor toxicidade, com redução por dois elétrons, mediada pela enzima de biotransformação de fase I DT-diaforase e gerando uma hidroquinona estável; (ii) uma de maior toxicidade, com redução por um elétron, mediada por diversas enzimas de biotransformação de fase I (e.g. NADPH-citocromo P450 redutase, NADH-citocromo b₅ redutase) gerando uma semiquinona instável capaz de gerar ciclos redox com produção contínua de O₂⁻. Além disso, as quinonas também podem ser conjugadas diretamente com GSH através das GST, ou ainda suas formas hidroquinonas podem ser sulfatadas ou glucuroniladas, para posterior excreção (BOLTON et al., 2000; MONKS et al., 1992).

A Men e outras quinonas já foram utilizadas como compostos modelos para a geração de estresse oxidativo em mexilhões e outros bivalves, os quais demonstraram alterações no estado tiólico celular e na atividade de enzimas antioxidantes, assim como na indução de danos oxidativos (BARATA et al., 2005; DAFRE et al., 2004; MCDONAGH; SHEEHAN, 2006). Utilizando o composto CDNB, a fim de diminuir a capacidade antioxidante dos organismos, seguido de uma exposição a Men como modelo de geração de ERO, também foi investigada a inter-

relação entre o sistema de defesa de biotransformação e antioxidante durante os processos de biotransformação em ostras *C. gigas*.

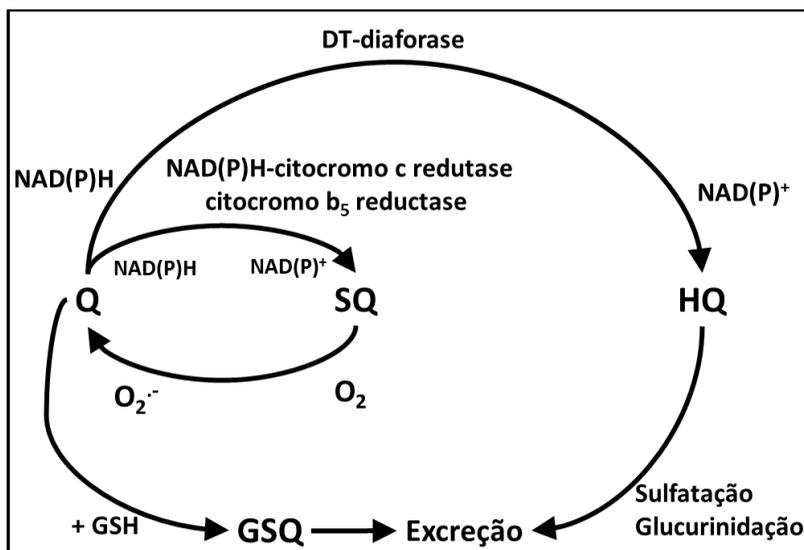


Figura 15: Metabolismo de biotransformação de quinonas (Q). Sua redução pode ocorrer por 2 elétrons (através da enzima DT-diaforase), gerando um composto estável hidroquinona (HQ), o qual pode ser excretado após sofrer processos de sulfatação ou glucuronidação. As quinonas também podem ser reduzidas por 1 elétron, gerando um ciclo redox com formação de uma semiquinona instável (SQ), a qual pode ser oxidada na presença de oxigênio e gerar O₂^{•-} e quinona, reiniciando o ciclo. Além disso, por serem agentes eletrofílicos, as quinonas também podem ser conjugadas com glutatona (GSH) através da glutatona S-transferase para posterior excreção.

1.4.3. Alterações redox em proteínas

A análise, quantificação e caracterização dos processos de oxidações de proteínas são fundamentais para compreender os processos oxidativos e as vias de regulação redox celulares (IZQUIERDO-ÁLVAREZ; MARTÍNEZ-RUIZ, 2011). Através destas análises é possível identificar proteínas sensíveis a estresse oxidativo em organismos sob influência de diferentes agentes oxidantes. Neste contexto, um conjunto de técnicas capazes de identificar e/ou quantificar o proteoma redox (conjunto de proteínas sensíveis a processos de oxidação e redução irreversíveis ou reversíveis) são conhecidas genericamente como proteômica redox, as quais utilizam ensaios de

proteômica (*in gel* ou *shotgun*), imunodeteção ou ainda colorimétricos (GO; JONES, 2013).

Estudos de proteômica redox iniciaram recentemente na área de ecotoxicologia aquática, sendo apontada como uma área de estudo promissora para o estudo com bivalves marinhos. Relatos científicos demonstraram que os processos de oxidação de proteínas estão relacionados à toxicidade de vários compostos em bivalves, entre eles: surfactantes (CHORA et al., 2009), quinonas (MCDONAGH; SHEEHAN, 2007, 2008), metais, peróxido (MCDONAGH; SHEEHAN, 2006; MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2006) ou mesmo em animais nativos de ambientes contaminados (MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005). É estimado que as proteínas são capazes de absorver até 70 % dos ERO durante situações de estresse oxidativo, podendo ser importantes alvos da toxicidade de contaminantes ambientais, e consequentemente susceptíveis à perda de função biológica (DAVIES, 2005).

No presente trabalho ensaios de proteômica redox foram realizados com o objetivo de investigar se processos de oxidação em proteínas fazem parte do mecanismo de toxicidade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) em ostras *C. gigas*. No Brasil, até o presente momento, não existem grupos de pesquisa realizando estudos de proteômica redox com bivalves marinhos, sendo este um trabalho inovador nesta área de estudo no país. Através da utilização da proteômica redox, espera-se ampliar a caracterização dos efeitos oxidantes de diferentes compostos nestes organismos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o funcionamento dos mecanismos de defesa antioxidante e de biotransformação em bivalves expostos a compostos eletrofílicos e oxidantes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo 1: Investigar os processos de biotransformação de fase II e da via do ácido mercaptúrico em ostras *C. gigas*

- Identificar os metabólitos derivados da via do ácido mercaptúrico utilizando o CDNB como composto eletrofílico modelo.
- Investigar a capacidade de metabolização e excreção do CDNB.
- Investigar o papel da brânquia, glândula digestiva e hemolinfa na proteção contra o CDNB.
- Analisar a modulação do sistema antioxidante na brânquia e glândula digestiva causada pela exposição ao CDNB.

Estudo 2: Investigar os sistemas peroxidáticos da GPx e Prx em mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas*.

- Analisar se o comprometimento de componentes dos sistemas peroxidáticos da GPx e Prx interfere na proteção contra peróxidos orgânicos e quinonas em mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas*.
- Investigar a detoxificação de peróxidos orgânicos exógenos em mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas* utilizando CHP como composto modelo.
- Analisar a resposta do sistema antioxidante e a relação entre o sistema de biotransformação de fase I e a toxicidade da menadiona em ostras *C. gigas*.

Estudo 3: Investigar a toxicidade e os alvos bioquímicos e celulares em ostras *C. gigas* expostas a nanopartículas de zinco (ZnONP).

- Analisar o potencial oxidante de ZnONP e a modulação do sistema antioxidante em ostras *C. gigas*.

- Analisar os alvos celulares da toxicidade de ZnONP. Analisar o perfil geral de oxidação de cisteínas de proteínas citosólicas e mitocondriais após exposição a ZnONP.
- Analisar o perfil geral de carbonilação de proteínas citosólicas e mitocondriais após exposição a ZnONP.
- Identificar proteínas diferencialmente expressas, carboniladas ou com oxidação em resíduos de cisteína pela técnica de proteômica redox

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Diferentes ensaios e análises foram realizados para cada um dos estudos desenvolvidos, conforme podem ser visualizados na Tabela 1 e delineados a seguir.

Tabela 1: Parâmetros analisados nos diferentes estudos realizados com mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas* expostas a agentes oxidantes e eletrofílicos.

Parâmetros analisados	Estudo 1	Estudo 2	Estudo 3
Quantificação de CDNB e de metabólitos da via do ácido mercaptúrico na água do mar e em tecidos de ostras	X		
Quantificação de glutathiona total, dissulfeto de glutathiona e tióis proteicos	X	X	X
Ensaio enzimático e de peroxidação lipídica	X	X	X
Análises de transcrição gênica	X		
Avaliação da capacidade de detoxificação de peróxidos <i>in vivo</i>		X	
Ensaio de mortalidade		X	X
Ensaio celular e de imunocompetência de hemócitos		X	X
Quantificação dos níveis de zinco			X
Análises por meio de microscopia eletrônica de transmissão			X
Ensaio de proteômica redox			X

3.1. ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO (ESTUDOS 1-3)

Mexilhões *P. perna* adultos (machos e fêmeas, 8-11 cm de comprimento) e ostras *C. gigas* adultas (machos e fêmeas, 8-13 cm de comprimento) foram obtidos de uma fazenda de cultivo marinho na praia do Ribeirão da Ilha, em Florianópolis - SC. Os animais foram

mantidos em laboratório por pelo menos 5 dias para aclimação em aquários de plástico com água do mar (salinidade 35‰) filtrada e esterilizada, na proporção de 1 litro de água do mar por animal, com aeração constante e temperatura entre 18 e 20°C. Os animais foram alimentados a cada dois dias com uma solução comercial de alimento para invertebrados marinhos filtrantes (Sera Marin Coraliquid®, Alemanha).

3.2. ESTUDO 1

3.2.1. Delineamento experimental

Neste primeiro estudo as etapas de biotransformação de fase II e da via do ácido mercaptúrico, assim como a modulação do sistema antioxidante foram estudadas em ostras *C. gigas* expostas ao agente eletrofílico CDNB. Um segundo agente eletrofílico (NEM) foi utilizado para depletar os níveis de GSH intracelulares na brânquia e permitir uma melhor compreensão da proteção mediada por este tecido nos processos de biotransformação de fase II de agentes eletrofílicos. Também foram comparados os efeitos do CDNB e NEM no sistema antioxidante através de duas vias de exposição (água do mar e hemolinfa, a fim de compreender o papel da brânquia como um forte ponto de entrada de agentes eletrofílicos).

Após a aclimação, ostras foram expostas a CDNB (10 µM, previamente dissolvido em etanol e adicionado na água do mar, concentração final de etanol de 0,01%) em aquários de vidro por 15 min, 1 h, 4 h, 10 h e 24 h e a brânquia, glândula digestiva e hemolinfa foram coletadas em cada tempo de exposição. Alíquotas da água do mar também foram coletadas ao longo do tempo. A quantificação dos níveis de CDNB, DNP-SG e metabólitos da via do ácido mercaptúrico foi realizada em todos os tecidos e tempos de exposição, enquanto que as análises moleculares e bioquímicas foram realizadas apenas após 4, 10 e 24 h de exposição na brânquia e glândula digestiva. A concentração de CDNB (10 µM) foi baseada em estudos preliminares iniciais com mexilhões *P. perna*, enquanto que os tempos de exposição escolhidos permitem o acompanhamento da biotransformação do CDNB e excreção de seus metabólitos, assim como a modulação no sistema antioxidante e de biotransformação a nível bioquímico e molecular.

Em uma segunda etapa, a exposição a CDNB também ocorreu diretamente através de injeções no músculo adutor a fim de atingir todos os tecidos. Para este objetivo, 0,3, 1 e 3 µmol de CDNB (previamente dissolvido em etanol e adicionado na água do mar, concentração final de etanol de 0,01%) foram preparados em 1 ml de xilose 1 M (1000

mOsm/L) e injetados no músculo adutor para atingir diretamente a hemolinfa, e conseqüentemente, o resto do organismo. Estes valores são equivalentes à quantidade de CDNB presente em uma exposição de CDNB pela água do mar nas concentrações de 0,3, 1 e 3 μM (ao utilizar 1 L de água do mar por animal). Devido à baixa solubilidade do CDNB em água do mar, foi utilizada a xilose como agente osmótico, ainda assim não sendo possível utilizar doses de CDNB equivalentes à uma exposição de CDNB 10 μM via água do mar (10 μmol via hemolinfa). Animais controle receberam somente o veículo (xilose 1 M). Após 24 h os animais foram sacrificados e a brânquia e glândula digestiva foram coletadas para ensaios bioquímicos.

Um terceiro experimento foi realizado a fim de observar a importância da GSH da brânquia no processo de biotransformação de fase II. Para este objetivo, a GSH foi depletada utilizando o agente eletrofílico NEM. Animais foram expostos a NEM (0, 1, 10, 100 e 1000 μM) adicionada na água do mar por 1 hora em aquários de vidro e a brânquia e glândula digestiva foram coletadas. Devido à rápida ação da NEM na depleção de SH celulares, este tempo de exposição foi utilizado ao invés de 24 h, o qual era utilizado nas exposições ao CDNB. Um segundo grupo de animais foi exposto a NEM através da injeção de NEM no músculo adutor: NEM (10, 100 e 300 μmol) foi preparada em 1 ml de água do mar e injetada no músculo adutor para atingir diretamente a hemolinfa e conseqüentemente o resto do organismo. Estes valores equivalem a uma exposição de NEM 10, 100 e 300 μM via água do mar (utilizando 1 L de água do mar por animal) Após 1 h os animais foram sacrificados e a brânquia e glândula digestiva foram coletadas para ensaios bioquímicos.

Animais também foram expostos sequencialmente a NEM e CDNB, a fim de observar se a depleção de GSH causada por NEM aumentada a toxicidade do CDNB. Após uma exposição de uma hora a NEM 100 μM adicionada na água do mar, os animais foram expostos a CDNB 10 μM por 24 h também adicionado na água do mar. Ao final do experimento os animais foram sacrificados e a brânquia e glândula digestiva foram coletadas para ensaios bioquímicos.

3.2.2. Síntese de padrões de metabólitos do CDNB da via do ácido mercaptúrico

Para a síntese do conjugado de CDNB com GSH (DNP-SG, vide seção 1.4.1), GSH e CDNB (1 mM) foram incubados por 4 h em tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1 M pH 7,0 contendo EDTA 0,25 mM e 1,5 μg de GST purificada de fígado equino.

Para a síntese dos demais metabólitos, foi utilizado 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno como composto para derivatização (HINCHMAN et al., 1991). Para o conjugado de CDNB com cisteína (DNP-CYS, vide seção 1.4.1), 2,5 mmol de 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (diluído em 25 ml de metanol) foram adicionados a 12,5 ml de KHCO_3 2 N contendo 2,5 mmol de cisteína. A solução foi mantida sob agitação magnética constante por 15 min e acidificada a pH 2 com HCl diluído. O precipitado foi coletado por filtração à vácuo e recristalizado à partir de água fervente. Para o conjugado de CDNB com N-acetilcisteína (DNP-NAC, vide seção 1.4.1) foi utilizada a mesma preparação, porém com 5 mmol de 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno em 5 ml de metanol e 5 mmol de N-acetilcisteína em 25 ml de KHCO_3 1 N. Não foi possível sintetizar o padrão 2,4-nitrofenil-cisteínil-glicina (DNP-CG) devido à sua alta instabilidade.

3.2.3. Quantificação dos níveis de CDNB e de metabólitos da via do ácido mercaptúrico na água do mar e tecidos de ostras

A determinação de DNP-SG, DNP-Cys e DNP-NAC foi realizada na água no mar, brânquia, glândula digestiva e hemolinfa de ostras expostas *in vivo* a CDNB 10 μM por 0 min, 15 min, 1 h, 4 h, 10 h e 24 h. Os níveis de CDNB foram determinados apenas na água do mar.

Brânquia e glândula digestiva (300 mg) foram homogeneizadas em tampão TRIS/HCl 0,1 M pH 8,0. A hemolinfa foi centrifugada a 1.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi guardado para as análises. Todas as amostras foram acidificadas com ácido perclórico (PCA, concentração final 5%) e centrifugadas a 15.000 x g por 2 min a 4°C, diluídas 5 – 35 vezes e filtradas com filtros descartáveis de 0,22 μm .

As amostras e os padrões foram analisados por cromatografia líquida de alta performance acoplada à leitura de UV/VIS. Foi utilizada uma coluna de cromatografia de C18 (25 X 250 mm) seguindo um protocolo de eluição isocrática (HINCHMAN et al., 1991). A temperatura da coluna foi ajustada para 30°C, com fluxo de 1 ml/min e 100 μl de amostra foi adicionado por análise. Para a determinação dos níveis de CDNB, a fase móvel consistia de uma combinação de acetonitrila e ácido acético (40% e 60%, respectivamente) e o cromatograma foi analisado em 280 nm. Para a análise de DNP-SG e metabólitos, a fase móvel consistia de uma combinação de acetonitrila e ácido acético (25% e 75%, respectivamente) e o cromatograma foi analisado a 340 nm.

3.2.4. Quantificação dos níveis de glutathiona total

Para a quantificação dos níveis de glutathiona total (GSH-t, a soma de GSH + GSSG), aproximadamente 50 mg de tecido fresco (brânquia e glândula digestiva) foram homogeneizados (1:10 peso:vol) em PCA 0,5 M seguido de centrifugação de 15.000 x g por 2 min a 4°C. O sobrenadante (extrato ácido) foi separado e neutralizado com KPi 0,1 M pH 7,0 contendo EDTA 1 mM. As amostras foram ensaiadas para GSH-t por um ensaio enzimático (AKERBOOM; SIES, 1981) utilizando um espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS ou uma leitora de placa Tecan Infinite M200. O meio de reação continha tampão KPi 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, NADPH 0,2 mM, DTNB 0,1 mM e GR 0,2 U/ml.

3.2.5. Ensaio enzimáticos e de peroxidação lipídica

Para o ensaio enzimático de proteínas, aproximadamente 200-300 mg de tecido foram homogeneizados (1:4 peso:vol) em tampão HEPES 20 mM pH 7,4. As amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 30 min a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios cinéticos. Para o ensaio da enzima de membrana GGT e determinação de peroxidação lipídica, o homogenato foi centrifugado a 1.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios.

A enzima GR foi analisada em 340 nm acompanhando a oxidação do NADPH utilizando GSSG como substrato (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). O ensaio foi realizado em KPi 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM GSSG.

A enzima TrxR foi analisada em 412 nm acompanhando a redução do DTNB na presença de NADPH (ARNÉR; ZHONG; HOLMGREN, 1999). O ensaio foi realizado em tampão KPi 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e albumina de soro bovino 0,2 mg/ml. Após 20 min de incubação, foi adicionado 200 µM de NADPH como substrato iniciador.

A enzima GST foi analisada em 340 nm acompanhando a conjugação do CDNB com GSH (HABIG; JAKOBY, 1981). O ensaio foi realizado em tampão KPi 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e GSH 1 mM. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM de CDNB.

A atividade da GGT foi realizada com um kit comercial, seguindo as instruções do fabricante (Biotécnica®, Brasil).

A peroxidação lipídica foi estimada através do ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram incubadas a 95°C por 1 h em meio contendo ácido acético 7,5% pH 3,5, butil

hidróxitolueno 70 μ M, ácido tiobarbitúrico 0,3% e SDS 0,4%. Após adição de butanol, a fase aquosa foi retirada e analisada para absorvância em 532 nm. Adaptado de Oakes e Van der Kraak (2003).

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

3.2.6. Análises de transcrição gênica

Brânquia e glândula digestiva (50 mg) de ostras expostas a CDNB 10 μ M (via água do mar) por 4, 10 e 24 h foram congeladas a -80°C na presença de RNA later® (Invitrogen). O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen). Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I (Fermentas) e a concentração e pureza de RNA foi estimada espectrofotometricamente (NanoVue, GE Healthcare). A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima Transcriptase reversa RevertAid® Reverse Transcriptase (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante.

A expressão relativa dos níveis de mRNA codificantes derivados de genes putativos para as isoformas da GST omega, pi e mi, além da Prx6 e GPx, foi realizada por análise de qPCR. Os iniciadores (Tabela 2) foram escolhidos baseados na literatura ou foram desenhados a partir de sequências de *C. gigas* depositadas no GeneBank, seguindo os seguintes parâmetros: tamanho de 18 – 20 pb, temperatura de anelamento entre 59-61°C, conteúdo de GC entre 40-60% e tamanho do produto de amplificação entre 90-200 pb. A eficiência dos iniciadores foi testada utilizando o método da curva padrão, com diluição seriada (1:3 a 1:63) a partir de uma amostra de cDNA obtida de um pool de amostras. Iniciadores com eficiência entre 1,8 e 2,2 foram utilizados. Todas as análises de qPCR foram realizadas em microplacas de 96 poços, em duplicata, com um volume final de reação de 10 μ l em um termociclador ABI7900HT (Applied Biosystems), de acordo com um protocolo utilizado em trabalho anterior (MELLO et al., 2012). Os resultados estão demonstrados como expressão relativa de transcritos normalizados pelo gene referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizando a equação de $2^{-(\Delta\Delta ct)}$ (PFAFFL, 2001). Esse gene foi utilizado como referência por não sofrer alterações em sua expressão nos diferentes grupos analisados.

Tabela 2. Genes selecionados com suas respectivas sequência de iniciadores utilizados para as análises de qPCR e números de acesso no GenBank.

Gene	Sequência 5'– 3'	GenBank
<i>GSTo</i>	Fw - TGATGAGTTCACCACCGCAA Rv - TTCAAACCATGGCCACAGCA	AJ557141.1
<i>GSTpi</i>	Fw - AGGCGATTTTCACCTCTGTC Rv - TTCCTTCTGCCACAAAGTCG	AJ557140.1
<i>GSTmi</i>	Fw - ACAAACCTTGGTTCGCTGGA Rv - AGGCTTCATCAGTCTGTGCT	AJ558252.1
<i>Prx6</i>	Fw - GAGCCAGAGTTCAGAAGAG Rv - TGCATTGTCCTTTTCGGCTG	AM265552.1
<i>GPx</i>	Fw - TCAAGATCCGAGATGTCTGTC Rv - ACTCGGTTTCCAGACATGAG	EF692639.1
<i>GAPDH</i>	Fw - GCTGTGACACCATTGGAGAA Rv - ACCAATGACGCAACAAGCGA	AJ544886.1

3.2.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados para normalidade de acordo com teste de Shapiro-Wilk e analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido do *post hoc* de Duncan quando necessário. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas utilizando o nível de significância de $p < 0,05$.

3.3. ESTUDO 2

3.3.1. Delineamento experimental

Neste segundo estudo, a importância da GR e TrxR para os sistemas de degradação de peróxidos em bivalves foi investigada utilizando CDNB e $ZnCl_2$ como inibidores destas enzimas. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa já apontaram para o efeito inibitório do $ZnCl_2$ na GR em mexilhões *P. perna* (vide seção 1.4.2), enquanto que o CDNB já foi utilizado como inibidor da TrxR em mamíferos (vide seção 1.4.2). A importância dessas enzimas foi investigada utilizando CHP ou Men como agentes oxidantes em animais previamente expostos a $ZnCl_2$ ou CDNB.

Após aclimação, mexilhões foram expostos a diferentes concentrações de zinco ($ZnCl_2$, 0, 30, 40, 50 e 100 μM) ou CDNB (0, 3, 6, 10 e 25 μM) por 18 h em aquários de vidro com 1 litro de água do mar por animal. Após a exposição, os animais foram sacrificados e as brânquias foram coletadas para os ensaios bioquímicos. No caso de ostras *C. gigas*, os animais foram expostos a CDNB (10 μM) por 18 h e a brânquia foi coletada para ensaios bioquímicos e celulares. Este tempo de exposição foi escolhido por permitir uma ação inibitória do CDNB e

ZnCl₂ nas enzimas, além de ser curto o suficiente para evitar uma resposta adaptativa dos organismos (geralmente observada mais em longo prazo). As concentrações de CDNB e ZnCl₂ utilizadas foram baseadas em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa com mexilhões (FRANCO et al., 2006) e células de mamíferos (dados não publicados).

Para mexilhões, os efeitos das inibições da GR e TrxR foram analisados utilizando uma pré-exposição a ZnCl₂ ou CDNB seguido de uma exposição a um agente oxidante (CHP). Animais pré-tratados com ZnCl₂ (40 µM) ou com CDNB (10 µM) por 18 h foram expostos a CHP (50 e 100 µM) por 2 h. Um terceiro grupo de animais foi exposto apenas a CHP por 2 h enquanto que outro grupo de animais foi mantido apenas em água do mar durante todo o experimento (grupo controle). Este período de exposição ao CHP foi utilizado por permitir o acompanhamento da taxa de degradação de peróxido ao longo do tempo, assim como a análise do estado tiólico, danos oxidativos e distúrbios celulares. Ao longo deste tempo de exposição, alíquotas de água do mar foram coletadas a fim de quantificar os níveis remanescentes de CHP (vide seção 3.3.3). Ao fim do experimento, a brânquia e hemolinfa foram coletadas para ensaios bioquímicos e celulares. Ensaios de mortalidade também foram realizados com mexilhões expostos a CHP (vide seção 3.3.4).

Para ostras, após exposição a CDNB (10 µM) por 18 h, a taxa de degradação de peróxidos foi analisada através de uma exposição a CHP (50 µM) por 2 h. Um segundo grupo de animais foi exposto apenas a CHP por 2 h enquanto que outro grupo de animais foi mantido apenas em água do mar durante todo o experimento (grupo controle). Alíquotas de água do mar foram coletadas ao longo do tempo para análise dos níveis remanescentes de CHP (vide seção 3.3.3).

Um conjunto adicional de experimentos foi realizado com ostras e a quinona Men, de acordo com o seguinte delineamento: animais controle foram mantidos por 18 h na água do mar, seguido de mais 24 h de exposição na água do mar (grupo AM/AM); animais expostos a CDNB 10 µM por 18 h foram mantidos posteriormente na água do mar por 24 h (grupo CDNB/AM); animais foram mantidos por 18 h na água do mar seguido de 24 h de exposição a Men (1 mM, grupo AM/Men); e animais expostos a CDNB 10 µM por 18 h foram expostos a Men 1 mM por 24 h (grupo CDNB/Men). Após o período de exposição (18 h + 24 h), os animais foram sacrificados e a brânquia e hemolinfa foram coletadas para ensaios bioquímicos e celulares. A concentração de Men (1 mM) e o tempo de exposição (24 h) foram escolhidos baseados em

outros trabalhos com bivalves expostos a quinonas (MCDONAGH; SHEEHAN, 2007; MCDONAGH; SHEEHAN, 2008; TEDESCO et al., 2010a). Ensaios de mortalidade também foram realizados com ostras expostas a Men (vide seção 3.3.4).

3.3.2. Ensaios enzimáticos

Após homogeneização (idem item 3.2.5.), as amostras foram ensaiadas espectrofotometricamente de acordo com métodos padrões.

As enzimas GR e TrxR foram analisadas de acordo com a seção 3.2.5.

A enzima GPx foi analisada em 340 nm em um ensaio acoplado com GR acompanhando a oxidação de NADPH (WENDEL, 1981). O ensaio foi realizado utilizando KPi 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 0,5 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM e GR 0,2 U/ml. CHP 1 mM foi utilizado como substrato iniciador.

A enzima menadiona redutase (Men redutase, também conhecida como DT-diaforase) foi analisada em 340 nm acompanhando a oxidação de NADPH na presença de Men (MASTERS et al., 1965). O ensaio foi realizado em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,6 contendo 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador foi utilizado Men 100 μ M. Dicumarol (50 μ M) foi adicionado para inibir a DT diaforase e avaliar a redução da Men dependente de dois elétrons.

A enzima NAD(P)H-citocromo c redutase foi analisada em 550 nm acompanhando a redução do citocromo c na presença de NADPH e Men (LIVINGSTONE; GARCIA MARTINEZ; WINSTON, 1989). O ensaio foi realizado em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,6 contendo NADPH 0,2 mM e citocromo c 20 μ M. Como substrato iniciador foi utilizado Men 300 μ M. A redução univalente da Men pela enzima gera uma quinona instável, a qual é oxidada a sua forma original na presença de oxigênio e gera $O_2^{\cdot-}$, o qual irá reduzir o citocromo c. A fim de confirmar de que a redução do citocromo c é dependente da geração de $O_2^{\cdot-}$, o ensaio também foi realizado na presença de SOD (30 μ g) no ensaio a fim de bloquear esta via de redução.

3.3.3. Avaliação da capacidade de detoxificação de peróxido *in vivo*

Para os experimentos a fim de quantificar os níveis de CHP na água do mar ao longo do período de exposição, os animais (mexilhões e ostras) foram acondicionados individualmente em béqueres contendo 300 ml de água do mar com aeração constante e aclimatados nessa condição por 1 hora a fim de garantir a abertura das valvas. Em seguida,

foram adicionados 200 ml de CHP preparado em água do mar (concentração final 50 ou 100 μM) e alíquotas do meio de exposição (35-50 μl) foram coletadas ao longo de 2 h. Dois grupos adicionais foram analisados: animais expostos apenas a água do mar (branco) e béquers contendo CHP na ausência de animais (para avaliar a autodegradação do CHP). As amostras foram imediatamente adicionadas em placas de 96 poços e o volume foi ajustado para 200 μl com água ultrapura. Em seguida, 50 μl do meio de reação (xilenol laranja 2,5 mM, sulfato de ferro amoniacal 2,5 mM e 1,1 mM de PCA) foram adicionados e a placa foi incubada no escuro por 30 min sob temperatura ambiente (GAY; GEBICKI, 2002). A placa foi lida em uma leitora TP-Reader (Thermo Plate) e os níveis de CHP foram estimados baseados em uma curva padrão de CHP.

No caso de mexilhões *P. perna*, a taxa de degradação de CHP foi estimada utilizando o cálculo do valor da área abaixo da curva (AAC) a partir de gráficos contendo os valores de CHP em relação ao tempo. A AAC do grupo controle foi considerada como 100% e as dos demais grupos foram normalizadas em relação ao grupo controle. Dessa forma, quanto maior a área, menor a capacidade de detoxificação de peróxido *in vivo*, devido ao acúmulo de CHP na água do mar ao longo do tempo. No caso de ostras *C. gigas*, a taxa de detoxificação foi mais lenta que em mexilhões, permitindo uma análise por regressão linear.

3.3.4. Mortalidade de ostras e mexilhões a agentes oxidantes

Curvas de mortalidade (CL_{50}) a CHP foi realizada com mexilhões. Os animais foram expostos a diferentes concentrações de CHP (0, 100, 300, 1000 e 3000 μM) por 96 h, com troca diária de água do mar e reposição de CHP. Após a análise da CL_{50} (96 h) do CHP, outro conjunto de experimentos foi realizado com animais expostos a CHP (100 e 300 μM) por 96 h, na presença ou ausência de uma pré-exposição a ZnCl_2 (40 μM) ou CDNB (10 μM) por 18 h. A mortalidade foi acompanhada ao longo do tempo. Um grupo de animais expostos apenas a ZnCl_2 e outro apenas a CDNB por 18 h foram mantidos em água do mar por 96 h para quantificar a mortalidade causada pela exposição a esses contaminantes na ausência de CHP.

Curvas de mortalidade também foram realizadas com ostras expostas a Men. Um grupo foi exposto a Men 300 μM por 96 h, com troca de água e reposição de Men diária. Um segundo grupo foi exposto a CDNB 10 μM por 18 h seguido de Men 300 μM por 96 h também com troca de água e reposição de Men diária. Um terceiro grupo foi exposto apenas a CDNB 10 μM por 18 h e mantido em água do mar por 96 h a

fim de investigar se o CDNB poderia induzir alguma mortalidade. O grupo controle foi mantido apenas em água do mar durante todo o experimento. Esta concentração de Men (300 μ M) foi utilizada para este experimento tendo em vista que trabalhos de curto prazo (24 h) com concentrações mais elevadas (1 mM) já apresentavam alterações em parâmetros bioquímicos em bivalves (MCDONAGH; SHEEHAN, 2007; MCDONAGH; SHEEHAN, 2008; TEDESCO et al., 2010a), os quais poderiam ser demasiadamente amplificados por uma exposição mais prolongada (96 h) seguida de uma pré-exposição a CDNB.

3.3.5. Quantificação dos níveis de glutathiona total, dissulfeto de glutathiona e tióis proteicos na brânquia

Os níveis de GSSG foram quantificados em aproximadamente 100 mg de tecido fresco homogeneizados (1:5 peso:vol) em NEM 6,25 mM. As amostras foram acidificadas com PCA (concentração final 0,5 M) e centrifugadas a 15.000 x g por 15 min a 4°C. O excesso de NEM foi removido utilizando um protocolo de hidrólise alcalina (SACCHETTA; DI COLA; FEDERICI, 1986) e as amostras analisadas utilizando o mesmo método para GSH-t.

A quantificação dos níveis de GSH-t foi realizada de acordo com a seção 3.2.4.1, enquanto que os níveis de PSH foram analisados colorimetricamente na fração particulada obtida após centrifugação dos homogenatos para ensaio de GSH-t. A fração particulada foi lavada com 1 ml de PCA 0,5 M, solubilizada com tampão TRIS-HCl 0,5 M pH 8,0 contendo SDS 1% e quantificadas para PSH por método colorimétrico (JOCELYN, 1987). O ensaio foi realizado em tampão TRIS/HCl 0,5 M pH 8,0 contendo SDS 1% e DTNB 0,2 mM.

3.3.6. Análises celulares e de imunocompetência em hemócitos

Após as exposições, a hemolinfa foi coletada através do músculo adutor e acondicionada em gelo. Em seguida, a hemolinfa foi processada para os ensaios de densidade celular, viabilidade celular pela redução do MTT e acúmulo de vermelho neutro, e danos no DNA pelo ensaio do cometa.

Para o ensaio de redução do MTT: 1 x 10⁶ células (após determinação da densidade celular utilizando uma câmara de Neubauer) foram centrifugadas a 800 x g por 15 min a 4°C e a fração particulada foi ressuspensa em 300 μ l de tampão fosfato salina (PBS) contendo NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM e MTT 0,5 mg/L. As amostras foram incubadas por 1 hora a 25°C no escuro e centrifugadas a 800 x g por 15 min a 4°C. O formazam formado durante

a incubação foi extraído em 300 µl de DMSO e as amostras foram lidas em 550 nm utilizando um espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS ou uma leitora de placa Tecan Infinite M200.

Para o ensaio do vermelho neutro (VN), 4 x 10⁵ células (após determinação da densidade celular utilizando uma câmara de Neubauer) foram centrifugadas a 800 x g por 15 min a 4°C e a fração particulada foi ressuspensa em 200 µl de PBS contendo VN 0,004%. As amostras foram incubadas por 3 h a 25°C no escuro e centrifugadas a 800 x g por 15 min a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 15 min a 4°C e lavadas 3 x com PBS para remover excesso de vermelho neutro extracelular. Após lavagem, as células foram incubadas com etanol 50% contendo ácido acético 1% e lidas em 550 nm utilizando um espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS ou uma leitora de placa Tecan Infinite M200.

Para o ensaio do cometa, utilizou-se um protocolo realizado anteriormente com mexilhões *M. edulis* (TRAN et al., 2007). Uma alíquota de 200 µl de hemolinfa foi centrifugada a 400 x g por 3 min a 4°C, as células foram ressuspensas em 160 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,75 %, preparada em PBS) e distribuídas em duas lâminas de vidro pré-tratadas com agarose. Após incubação a 4°C, as amostras foram incubadas em tampão de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, TRIS 10 mM, Triton 1%, DMSO 10 % e pH 10) a 4°C por 1 h. Em seguida, as amostras foram lavadas com água ultrapura, acondicionadas em câmara de eletroforese horizontal e incubadas em solução contendo NaOH 0,3 M e EDTA 200 mM (pH 13) por 20 min. A eletroforese foi realizada por 30 min a 300 mA, as amostras foram lavadas com água ultrapura e neutralizadas em tampão TRIS/HCl 0,4 M pH 7,5. As amostras foram coradas com nitrato de prata e analisadas em microscópio óptico. 50 células foram contadas para cada réplica (100 por amostra), e caracterizadas de 0 a 4 de acordo o tamanho da cauda e, conseqüentemente, do dano ao DNA (classe 0 corresponde à ausência de dano classe 4 corresponde à dano máximo). O índice de dano corresponde à soma de das categorias de dano analisadas para cada amostra, variando entre 0 e 400 (SINGH et al., 1988).

3.3.7. Análises estatísticas

As análises de sobrevivência foram realizadas por análise de PROBIT pelo teste de Mantel-Cox.

Os demais dados foram analisados para normalidade de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e os pares de médias foram analisados pelos teste t de Student enquanto que comparações múltiplas foram

realizadas por ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan quando necessário. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas utilizando o nível de significância de $p < 0,05$.

3.4. ESTUDO 3

3.4.1. Caracterização de ZnONP

ZnONP (dispersão em acetato de butila, Sigma Aldrich #721093) foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento dinâmico da luz. Para análise por MET, ZnONP foram inicialmente diluídas em DMSO seguido de diluição em água do mar para uma concentração final de 50 mg/L. Uma alíquota foi adicionada a uma tela de cobre seguido de secagem ao ar para posterior análise em microscópio JEM-1011 (JEOL) a 80 KV. O tamanho das partículas primárias foi determinado a partir de imagens de 1000 partículas selecionadas aleatoriamente utilizando o software Image J para a quantificação (versão 1.47; obtido do website <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para a análise de espalhamento dinâmico da luz, dispersões de ZnONP foram preparadas em DMSO puro ou em água do mar, em concentrações de 8 a 32 mg/L. As amostras foram analisadas em um Zetasizer Nano series (Malvern Instruments). Duas réplicas foram analisadas por amostra, cada uma com 11 leituras por réplica. DMSO foi utilizado como solvente para esta análise por ser utilizado para pré-dissolver as ZnONP antes das exposições, conforme descrito a seguir.

Devido à baixa solubilidade do acetato de butila na água do mar, as ZnONP foram inicialmente diluídas em DMSO para posterior adição na água do mar durante as exposições. Para os experimentos da taxa de mortalidade, as concentrações de acetato de butila e DMSO foram ajustadas para 80 e 102 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, para todos os grupos (inclusive o controle). No caso dos demais experimentos, as concentrações utilizadas de acetato de butila e DMSO foram de 6,4 e 102 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Estes valores estão bem abaixo da CL_{50} (24 h) destes compostos para organismos aquáticos como invertebrados (DMSO = 27,5 g/L para *Daphnia pulex* e acetato de butila = 205 mg/L para *Daphnia magna*), de acordo com os dados dos fornecedores (Sigma-Aldrich). As concentrações de acetato de butila variaram entre os diferentes experimentos uma vez que as ZnONP estavam dispersas neste composto, e dessa forma alterações nas concentrações de ZnONP também afetavam as concentrações do solvente (para os ensaios de

mortalidade, a maior concentração de ZnONP foi de 50 mg/L, enquanto que para as demais exposições foi de 4 mg/L).

3.4.2. Delineamento experimental

Após aclimatação, ostras foram expostas a diferentes concentrações de ZnONP (0,05, 0,5, 5 e 50 mg/L) e ZnCl₂ (0,136, 1,36, 13,6, 136 e 1360 mg/L) por 96 h e a taxa de mortalidade foi analisada (14 animais por grupo). Durante o experimento a água foi trocada a cada 24 h com reposição de ZnONP e ZnCl₂. Essas concentrações foram baseadas em experimentos de toxicidade de ZnONP com outros invertebrados (WONG et al., 2010; YU et al., 2011; ALI et al., 2012).

Um segundo experimento foi realizado com ostras expostas a ZnONP 4mg/L por 6, 24 e 48 h a fim de elucidar o mecanismo de toxicidade deste nanomaterial. A água do mar foi trocada a cada 24 h, com reposição de ZnONP. Ao fim do experimento a brânquia e glândula digestiva foram coletadas para ensaios químicos e de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Este experimento possuiu apenas um grupo controle (exposto ao veículo por 48 h). Durante a exposição, alíquotas da água do mar foram coletadas para análise química. ZnONP também foram adicionadas a béqueres com água do mar sob aeração constante na ausência de animais, e alíquotas da água do mar foram coletadas ao longo do tempo a fim de estimar a taxa de precipitação das ZnONP na água do mar. A fim de quantificar a dissociação de ZnONP em Zn²⁺, alíquotas de ZnONP obtidas de aquários na ausência de animais foram coletadas ao longo do tempo. As amostras foram processadas por ultrafiltração utilizando filtros com ponto de exclusão de 10 kDa (equivalente a nanopartículas de 2 nm). O material eluído do filtro foi utilizado para a quantificação de Zn²⁺ dissociado.

Um terceiro experimento foi realizado com ostras expostas a ZnONP por 24 ou 48 h. A água foi trocada a cada 24 h com reposição de ZnONP. Ao fim do experimento, os animais foram sacrificados e a hemolinfa, brânquia e glândula digestiva foram coletadas para ensaios bioquímicos e celulares. Um grupo controle foi utilizado para cada tempo de exposição (24 e 48 h). Os tecidos também foram enviados em gelo seco para a *Univeristy College Cork*, na República da Irlanda, para ensaios de proteômica redox.

3.4.3. Quantificação dos níveis de zinco

Os níveis de zinco foram analisados na água do mar e nos tecidos de ostras (brânquia e glândula digestiva) durante a exposição a ZnONP,

de acordo com um protocolo utilizado anteriormente com mexilhões *M. edulis* (TREVISAN et al., 2011).

As amostras de água do mar foram acidificadas com HNO₃ 5%. Os tecidos (500 mg de tecido seco a 80°C) foram acidificados com 7 ml de solução de HNO₃ e HCL concentrado (1,5:1 vol:vol) em uma chapa quente e diluídos para 50 ml com água ultrapura. As amostras foram analisadas para o conteúdo de zinco por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente.

3.4.4. Análise de tecidos por MET

Amostras (aproximadamente 5 mm) de brânquia e glândula digestiva de ostras após exposição a ZnONP foram fixadas em tampão contendo glutaraldeído 2,5% e cacodilato de sódio 100 mM (pH 7,2) (SCHMIDT et al., 2009). O material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio por 4 h, desidratado em gradiente seriado de acetona e coberto com resina do tipo *Spurr*. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila aquoso seguido citrato de chumbo. As amostras (4 amostras por grupo com duas réplicas cada) foram analisadas por MET utilizando um microscópio JEOL 1011 a 80 kV no Laboratório de Microscopia Central, da Universidade Federal de Santa Catarina. As células analisadas foram células ciliadas e com microvilosidades do epitélio da brânquia e as células digestivas dos túbulos digestivos da glândula digestiva.

3.4.5. Análise dos níveis de glutathiona total, dissulfeto de glutathiona e tíóis proteicos

As análises de GSH-t, GSSG e PSH foram realizadas de acordo com as seções 3.2.4 e 3.3.5.

3.4.6. Análises celulares e de imunocompetência em hemócitos

Hemócitos de ostras *C. gigas* foram coletados ao fim da exposição e ensaiadas para análises de viabilidade celular pelo método do MTT e vermelho neutro conforme descrito na seção 3.3.6.

A taxa de fagocitose dos hemócitos foi analisada através da incubação de 100 µL de hemolinfa com 30 µL de microesferas fluorescentes (*Fluoresbrite YG microspheres*, 2,00 µm, Polysciences) preparadas a 2,5 % em água do mar. Em seguida, foram adicionados 200 µL de água do mar filtrada estéril e as amostras foram incubadas por 1 h, no escuro, a 20 °C (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003). O percentual de hemócitos altamente fagocíticos (que fagocitaram 3 ou

mais esferas) em cada amostra foi determinado através de citometria de fluxo em um FACSCanto II (BD Biosciences).

A taxa de adesão celular dos hemócitos foi avaliada pela adição de 100 µL de hemolinfa e 100 µL de água do mar filtrada estéril em uma placa de 24 poços, permitindo a adesão por 2 h a 20 °C. Após esse período o sobrenadante de cada poço foi removido, filtrado (80 µm) e transferido para um tubo de citometria contendo 200 µl de uma solução de PBS/formol 4 %. O número de células que não foram capazes de aderirem à placa foi determinado por microscopia óptica utilizando uma câmara de Newbauer.

A produção de ERO intracelular foi determinada nos hemócitos usando o reagente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (Sigma). Para tal, 100 µL de hemolinfa foram incubados com 4 µL de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína a 1 mM e 300 µL de água do mar filtrada estéril por 2 h, no escuro, a 20 °C (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003). O nível de fluorescência derivado da oxidação do fluoróforo foi determinado em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences), do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia I da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.4.7. Ensaios enzimáticos e detecção dos níveis de peroxidação lipídica

Para a análise dos níveis de peroxidação lipídica e das enzimas GR, TrxR, GPx e Cat, as amostras foram preparadas de acordo com a seção 3.2.5.

Os níveis de peroxidação lipídica e as enzimas GR e TrxR foram ensaiadas de acordo com a seção 3.2.5 enquanto que a enzima GPx foi ensaiada de acordo com a seção 3.3.2.

A enzima Cat foi analisada seguindo a dismutação do H₂O₂ a O₂ em 240 nm (AEBI, 1984). O ensaio enzimático de 40 segundos foi realizado em tampão KPi 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 0,5 mM e 0,012 % de Triton X-100. Como substrato iniciador foi utilizado 10 mM de H₂O₂.

Para as demais enzimas, as proteínas citosólicas foram obtidas em homogeneização (1:3, peso:vol) de aproximadamente 200 mg de tecido em tampão TRIS/HCl 10 mM pH 7,2 contendo sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M, EDTA 1mM e PMSF 1 mM. Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 x g por 1 h a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios cinéticos. Para as análises com proteínas mitocondriais, os tecidos (300 mg) foram homogeneizados (1:4, peso:vol) em tampão mitocondrial HEPES 20 mM pH 7,5 contendo

sacarose 0,4 M, KCl 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e EGTA 1 mM. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 1.000 x g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C. A fração particulada foi lavada 2 vezes com tampão mitocondrial e usada como uma fração enriquecida de mitocôndrias (ULRICH; MARSH, 2009). A fração particulada foi ressuspensa em 300 µl de tampão mitocondrial e sonicadas para a liberação de proteínas em 5 ciclos de 15 segundos.

A enzima citosólica glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi analisada em 340nm acompanhando a redução de NADP^+ na presença de glicose 6-fosfato (GLOCK; MCLEAN, 1953). O ensaio foi realizado utilizando tampão TRIS/HCL 50 mM pH 7,4, contendo NADP^+ 0,127 mM e 3 mM de cloreto de magnésio. Como substrato iniciador foi utilizado 1,5 mM de glicose-6-fosfato.

A enzima citosólica GAPDH foi analisada acompanhando a redução do NAD^+ em 340 nm utilizando gliceraldeído 3-fosfato na presença de DTT (ZHANG; SNYDER, 1992). O ensaio foi realizado em tampão pirofosfato de sódio 15 mM pH 8,5 contendo NAD^+ 0,25 mM e DTT 3,3 mM. Como substrato foi utilizado o gliceraldeído-3-fosfato 0,5 mM.

A enzima mitocondrial NADH:ubiquinona oxidoreductase (complexo mitocondrial I) foi analisada seguindo a redução de ferrocianeto (0,5 mM) na presença de NADH (0,2 mM) e rotenona (5 µM) (CASSINA; RADI, 1996).

A enzima mitocondrial citocromo c oxidase (complexo mitocondrial IV) foi analisada em 550 nm seguindo a oxidação do citocromo c (STORRIE; MADDEN, 1990). O ensaio foi realizado em tampão TRIS/HCL 8,5 mM pH 7,0 contendo KCl 100 mM e sacarose 25 mM. Como substrato iniciador foi utilizado citocromo c (reduzido) 10 mM.

3.4.8. Análises de proteômica

A obtenção de proteínas citosólicas foi realizada a partir da homogeneização das amostras em tampão TRIS/HCL 10 mM pH 7,2 contendo sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M, EDTA 1mM e PMSF 1 mM, seguindo o protocolo da seção 3.4.7. As proteínas mitocondriais foram obtidas a partir de homogeneização das amostras em tampão mitocondrial HEPES 20 mM pH 7,5 contendo sacarose 0,4 M, KCl 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e EGTA 1 mM, também conforme protocolo da seção 3.4.7.

Em seguida, para ambas as análises de eletroforese unidimensional (1DE) e bidimensional (2DE) foram utilizados géis de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Os extratos proteicos foram marcados com os fluoróforos (entre 0,4 e 0,5 KDa) 5-iodoacetamida-fluoresceína (IAF, 0,2 mM) ou 5-tiosemicarbazida-fluoresceína (FTSC, 1mM) por 2 horas no escuro a 4°C para a marcação de tióis reduzidos ou grupos carbonilas, respectivamente. Em seguida, as amostras foram acidificadas com ácido tricloroacético (concentração final 10%) e incubadas no gelo por 5 minutos, seguido de centrifugação a 11.000 x g por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. A fração particulada foi lavada 2 vezes com 1 ml de acetona (para marcação com IAF) ou etanol:acetato de etila (1:1 vol:vol, para marcação com FTSC) e mantidas a -80°C até análises posteriores.

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 contendo 2,5 % SDS, 10 % glicerol e traços de azul de bromofenol) para 1DE SDS-PAGE ou de reidratação (ureia 5 M, tiourea 2 M, CHAPS 2 % (peso:vol), anfólitos 2 % (pH 3-10), DTT 2 %, DesTreak 1 % e traços de azul de bromofenol) para 2DE SDS-PAGE.

Para os ensaios de 1DE SDS-PAGE, amostras de brânquia e glândula digestiva (24 e 48 h de exposição a ZnONP) foram analisadas. Para as proteínas citosólicas, 25 µg de proteínas foram utilizadas por poço enquanto que para proteínas mitocondriais foram utilizadas 25 µg para amostras marcadas com IAF e 12,5 µg para amostras marcadas com FTSC. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE (gel de separação de 12 ou 10% de acrilamida para proteínas citosólicas ou mitocondriais, respectivamente, e gel de empacotamento de 4,5 % de acrilamida) utilizando 80 V seguido de 120 V até o desaparecimento do azul de bromofenol. Após a eletroforese, os géis foram imediatamente escaneados para fluorescência (excitação/emissão 488/520 nm) e corados com Coomassie azul coloidal por 18 h. Os géis foram lavados e escaneados para o sinal de Coomassie com um densitômetro previamente calibrado. As imagens dos géis escaneados para fluorescência e Coomassie foram analisadas utilizando o software Quantity One (BioRad). O sinal de fluorescência foi normalizado pelo sinal de Coomassie para cada amostra, a fim de evitar qualquer variabilidade devido a possíveis diferenças nas concentrações proteicas aplicadas por poço.

Para os ensaios de 2DE SDS-PAGE, apenas amostras de proteínas citosólicas de brânquias após 48 h de exposição a ZnONP foram utilizadas. Não foi possível analisar a glândula digestiva devido a

dificuldades com a solubilização de proteínas. Após a marcação com os fluoróforos, 200 µg de proteínas foram ressuspensas em tampão de reidratação. As amostras foram transferidas a tiras de eletrofocalização de 7 cm (pH 3-10, não linear) e as mesmas foram reidratadas por 18 h a temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram eletrofocalizadas em aparelho Protean (BioRad) a 20°C com um aumento de voltagem linear: (i) 1h 250 V, (ii) 2 h 4.000 V, (iii) 20.000 Vh. As tiras foram equilibradas por 20 min com tampão TRIS/HCl 0,375 M pH 8,8 contendo ureia 6 M, SDS 2 %, glicerol 20 % e DTT 2 %. Em seguida, as amostras foram equilibradas novamente por 20 min em mesmo tampão, trocando o DTT por iodoacetamida 2,5 %. As tiras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % a 120V. Os géis foram imediatamente escaneados para fluorescência (excitação/emissão 488/520 nm), corados com Coomassie coloidal e escaneados com um densitômetro calibrado. As imagens de fluorescência e da coloração de Coomassie foram analisadas pelo software SameSpots (Nonlinear Dynamics) para a detecção de proteínas com diferentes perfis de expressão (coloração de Coomassie), oxidação de tióis (IAF) e carbonilação (FTSC).

As proteínas com uma diferença de no mínimo 50% de aumento ou diminuição no volume dos “spots” e um valor estatístico de $p < 0,05$ com relação ao grupo controle foram escolhidas para posterior identificação por espectrometria de massa. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico do software SameSpots. Apenas proteínas com bom padrão de separação foram coletadas a partir de géis corados com Coomassie coloidal. Algumas proteínas não puderam ser coletadas devido à baixa abundância proteica e, conseqüentemente, baixa intensidade de coloração de Coomassie azul coloidal.

Para a purificação de proteínas mitocondriais contendo -SH livres, grupos de brânquias de 5 a 6 animais foram homogeneizados em tampão mitocondrial (1:3 peso:vol), com 2 “pools” por grupo (controle e exposto a ZnONP por 48 h). Após a obtenção dos extratos proteicos mitocondriais (seção 3.4.6), 2 mg de proteínas foram incubadas com ureia 6 M por 10 minutos a temperatura ambiente para a total desnaturação das proteínas, seguido da adição de 20 mg de sefarose com tiol ativado (GE Healthcare®, Reino Unido) e tampão de ligação (TRIS/HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M e EDTA 1 mM). As amostras foram incubadas por 2 h no escuro a 4°C sob agitação constante e centrifugadas a 4.500 x g por 3 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado (proteínas sem grupos tiólicos livres) enquanto que a

fração particulada (separose com tiol ativado conjugado a proteínas com grupos tiólicos livres) foi lavada 9 vezes com tampão de ligação seguido da adição de tampão de eluição (tampão de ligação com DTT 25 mM). As amostras foram incubadas no gelo por 1 hora e em seguida centrifugadas a $4.500 \times g$ por 3 minutos e o sobrenadante separado para identificação das proteínas por espectrometria de massa.

3.4.9. Análises estatísticas

Os dados foram analisados para normalidade de acordo com teste de Shapiro-Wilk e analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido do *post hoc* de Duncan quando necessário. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas utilizando o nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDO 1

4.1.1. Padronização da análise de CDNB e metabólitos em água do mar e tecidos de ostras *C. gigas*

A fim de investigar os processos de incorporação, metabolização (biotransformação de fase II e via do ácido mercaptúrico, vide Fig. 14) e excreção de CDNB, assim como o papel diferencial da brânquia, glândula digestiva e hemolinfa nestes processos, a síntese dos padrões DNP-SG, DNP-CYS e DNP-NAC foi realizada para a quantificação destes compostos por cromatografia líquida de alta performance seguido de análise UV/VIS. O processo de metabolização do CDNB pode ser resumido na seguinte fórmula:

CDNB → (conjugação com GSH via GST) → *DNP-SG* → (remoção dos resíduos de gamma-glutamil e glicinil por peptidases) → *DNP-CYS* → (acetilação via N-acetiltransferases) → *DNP-NAC* → excreção.

A quantificação dos níveis de CDNB na água do mar também foi realizada de maneira semelhante. Conforme comentado na seção 3.2.2, não foi possível sintetizar o padrão DNP-CG, composto intermediário da via do ácido mercaptúrico entre o DNP-SG e DNP-CYS, e desta forma não foi possível realizar a análise deste composto. Cromatogramas representativos dos padrões usados para a determinação de CDNB, DNP-SG, DNP-CYS e DNP-NAC podem ser visualizadas nas figuras 16, 17 e 18.

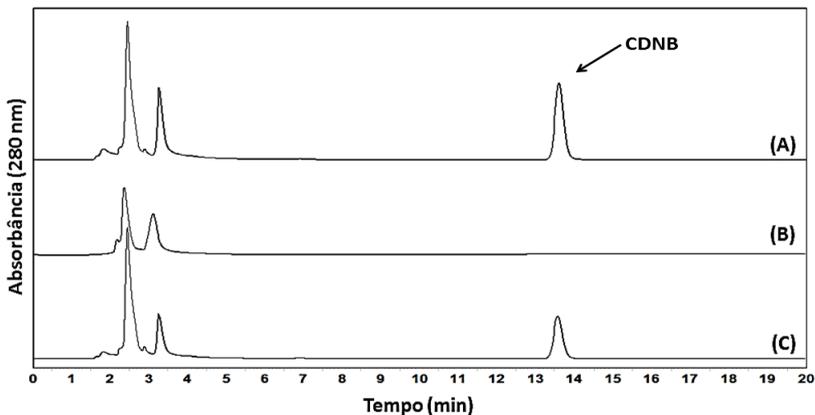


Figura 16: Cromatograma representativo da análise dos níveis de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na água do mar. (A) Padrão de CDNB 10 μM preparado em água do mar; (B) água do mar do grupo controle (0 h); (C) água do mar do grupo de *Crassostrea gigas* expostas a CDNB 10 μM coletada após 1 h de exposição. As amostras (100 μl) foram analisadas em 280 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (40:60%) com fluxo constante de 1ml/min. Os picos obtidos antes de 4 min são os primeiros picos de eluição, não sendo relacionados com a presença de compostos de interesse.

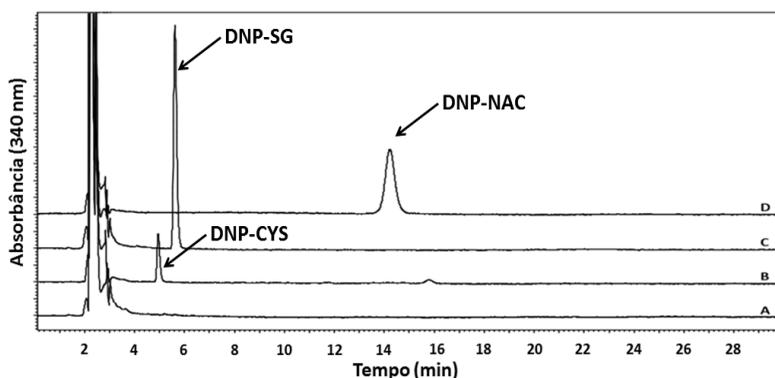


Figura 17: Cromatograma representativo dos padrões de 2,4-dinitrofenil-glutationa (DNP-SG), 2,4-dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) e 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC). (A) Branco, (B) DNP-CYS 10 μM , (C) DNP-SG 10 μM , (D) DNP-NAC 10 μM . As amostras (100 μl) foram analisadas em 340 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (25:75%) com fluxo constante de 1ml/min. Os picos obtidos antes de 4 min são os primeiros picos de eluição, não sendo relacionados com a presença de compostos de interesse.

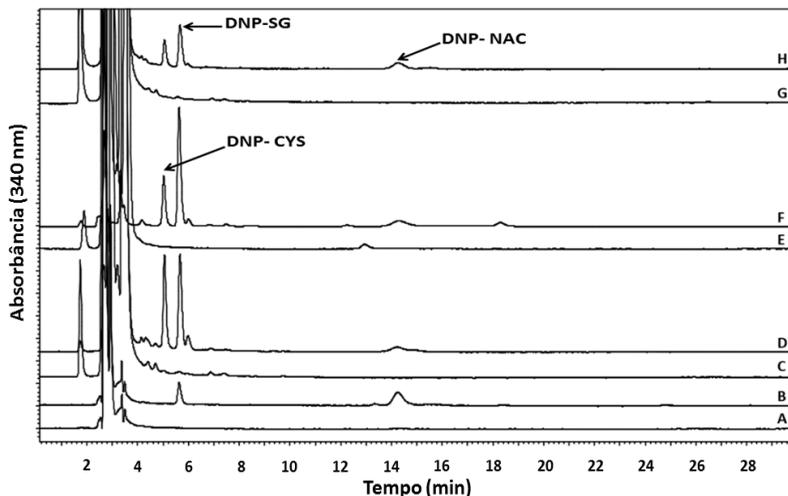


Figura 18: Cromatograma representativo da análise dos níveis de 2,4-dinitrofenil-glutationa (DNP-SG), 2,4-dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) e 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC) na água do mar, brânquia, glândula digestiva e hemolinfa de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μ M por 24 h. (A) Água do mar logo após adição de CDNB (tempo 0 h); (B) água do mar após 10 h de exposição à CDNB; (C) brânquia tempo 0 h; (D) brânquia após 4 h de exposição a CDNB; (E) hemolinfa tempo 0 h; (F) hemolinfa após 4 h de exposição a CDNB; (G) glândula digestiva tempo 0 h; (H) glândula digestiva após 10 h de exposição a CDNB. As amostras (100 μ l) foram analisadas em 340 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (25:75%) com fluxo constante de 1ml/min. Os picos obtidos antes de 4 min são os primeiros picos de eluição, não sendo relacionados com a presença de compostos de interesse.

4.1.2. Absorção de CDNB, metabolização e excreção de metabólitos por *C. gigas*

O CDNB apresentou um curto tempo de meia vida na água do mar (aproximadamente 1 h) durante a exposição de ostras *C. gigas* a CDNB 10 μ M (Fig. 19A). Após 10 h de exposição, aproximadamente 5% dos níveis iniciais de CDNB ainda se encontravam disponíveis na água do mar (Fig. 19A), indicando uma rápida absorção deste composto pelos organismos. Foi observado que ao longo do tempo a água do mar apresentou uma coloração amarelada, assim como um aumento contínuo na sua absorbância em 340 nm a partir de 4 h de exposição (Fig. 19B), possivelmente relacionado com a excreção de metabólitos do CDNB.

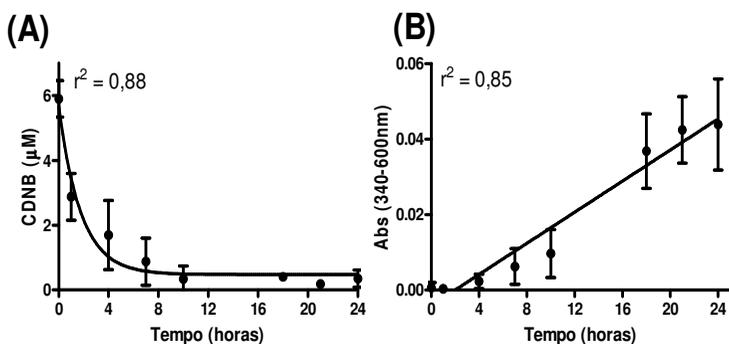


Figura 19: Níveis de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na água do mar e absorbância em 340 nm da água do mar durante exposição de ostras *Crassostrea gigas* a CDNB 10 µM. (A) Quantificação dos níveis de CDNB por cromatografia líquida de alta performance. As amostras (100 µl) foram analisadas em 280 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (40:60%) com fluxo constante de 1ml/min; (B) valores de absorbância por espectrofotometria em 340 nm, descontado o valor de absorbância em 600 nm. Dados estão representados como média ± desvio padrão (n = 4 – 6).

A quantificação dos níveis de DNP-SG e seus metabólitos (DNP-CYS e DNP-NAC) foi realizada na água do mar, brânquia, glândula digestiva e hemolinfa de ostras durante a exposição a CDNB 10 µM, utilizando curvas padrões baseadas na absorbância dos padrões obtidos como descrito na seção 3.2.2. Tão rápido como 15 e 60 min de exposição foram detectadas as concentrações mais elevadas do DNP-SG na brânquia (Fig. 20A), com valores de 187 e 215 µM, respectivamente, baixando para 47,7 µM após 4 h. O pico máximo (1h) corresponde ao tempo de meia vida do CDNB na água do mar. Na glândula digestiva, durante este mesmo período, os níveis de DNP-SG aumentam gradativamente de 6,8 em 15 min para 30,0 µM após 4 h (Fig. 20A). Na hemolinfa, os valores permaneceram baixos, entre 3 e 7 µM durante o mesmo período (Fig. 20A). A partir de 4 h, os valores de DNPSG baixaram em todos os tecidos, chegando a valores entre 0,02 e 2 µM (Fig. 20A, pequeno gráfico). Na água do mar, os níveis de DNP-SG oscilaram entre 0,007 e 0,19 µM (Fig. 20B).

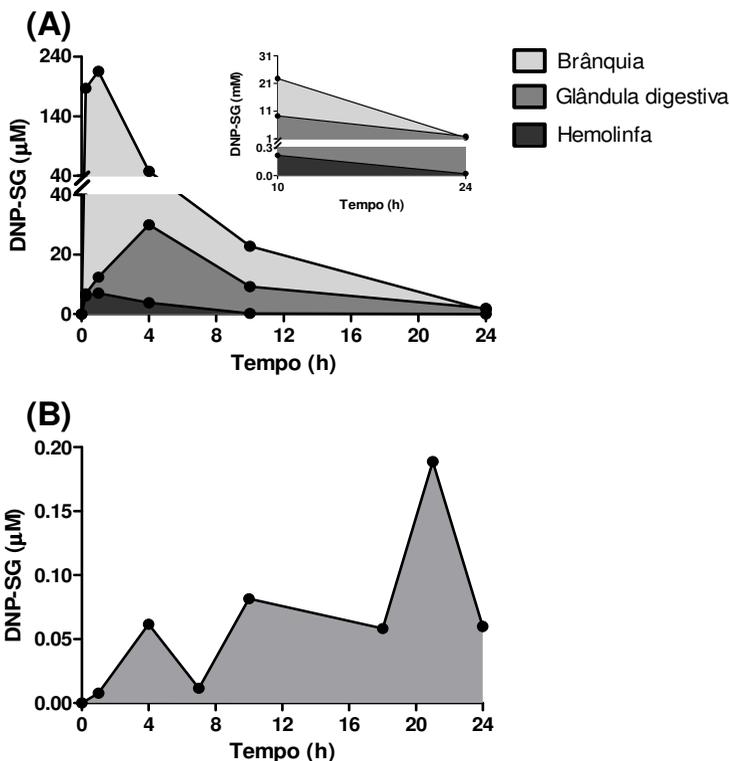


Figura 20: Níveis de 2,4-dinitrofenil-glutaciona (DNP-SG) nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por 24 h. (A) Níveis de DNP-SG na brânquia, glândula digestiva e hemolinfa. No gráfico menor, detalhe dos níveis de DNP-SG nos tecidos entre 10 e 24 h. (B) Níveis de DNP-SG na água do mar. As amostras (100 µl) foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em 340 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (25:75%) com fluxo constante de 1ml/min. Dados estão representados como média (n = 3).

Um padrão de resposta semelhante foi detectado para o composto DNP-CYS, o qual é obtido após a remoção dos resíduos de γ -glutamil e glicina do DNP-SG. Entretanto, os valores encontrados nos tecidos foram mais elevados: na brânquia, os valores atingiram 330 µM em 60 min, diminuindo para 201 µM após 4 h (Fig. 21A). Na glândula digestiva, os valores subiram de 14,5 µM em 15 min para 153 µM após

4 h, enquanto na hemolinfa os valores subiram de 30,7 μM para 117 μM após 4 h (Fig. 21A). Assim como com o DNP-SG, ocorreu um rápido decaimento nos níveis de DNP-CYS nos tecidos a partir de 4 h de exposição. Após 24 h, os valores de DNP-CYS ficaram entre 1,2 e 5,5 μM em todos os tecidos (Fig. 21A, pequeno gráfico). Na água do mar, este composto só foi detectado nos tempos 10 e 18h (Fig. 21B).

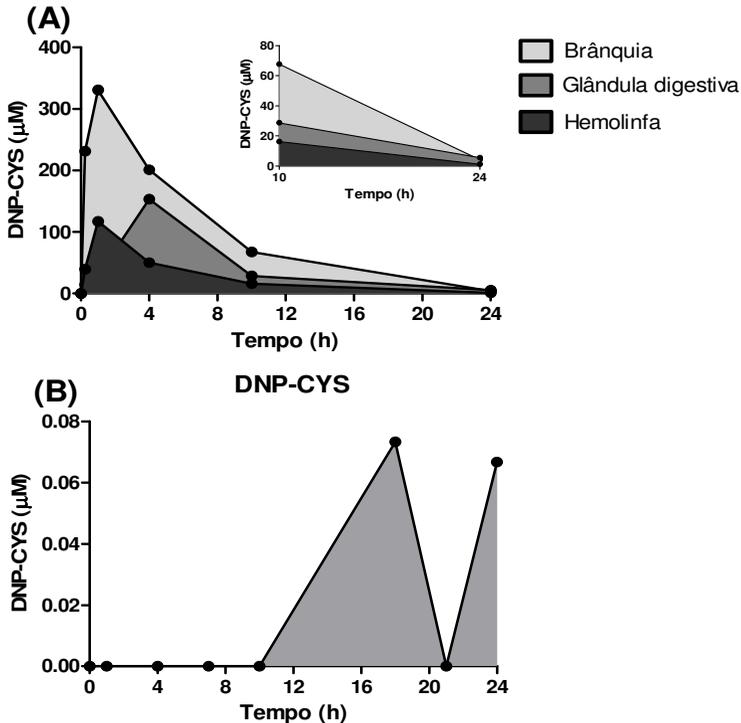


Figura 21: Níveis de 2,4-dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μM por 24 h. (A) Níveis de DNP-CYS na brânquia, glândula digestiva e hemolinfa. No gráfico menor, detalhe dos níveis de DNP-CYS nos tecidos entre 10 e 24 h. (B) Níveis de DNP-SG na água do mar. As amostras (100 μl) foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em 340 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (25:75%) com fluxo constante de 1ml/min. Dados estão representados como média (n = 3).

O DNP-NAC, composto final da via do ácido mercaptúrico obtido a partir da metabolização do CDNB, apresentou um padrão diferente dos demais compostos. Apesar dos níveis deste composto também terem aumentado nos tecidos nas primeiras 4 h de exposição, os valores foram mais baixos (Fig. 22A) que os de DNP-SG e DNP-CYS.

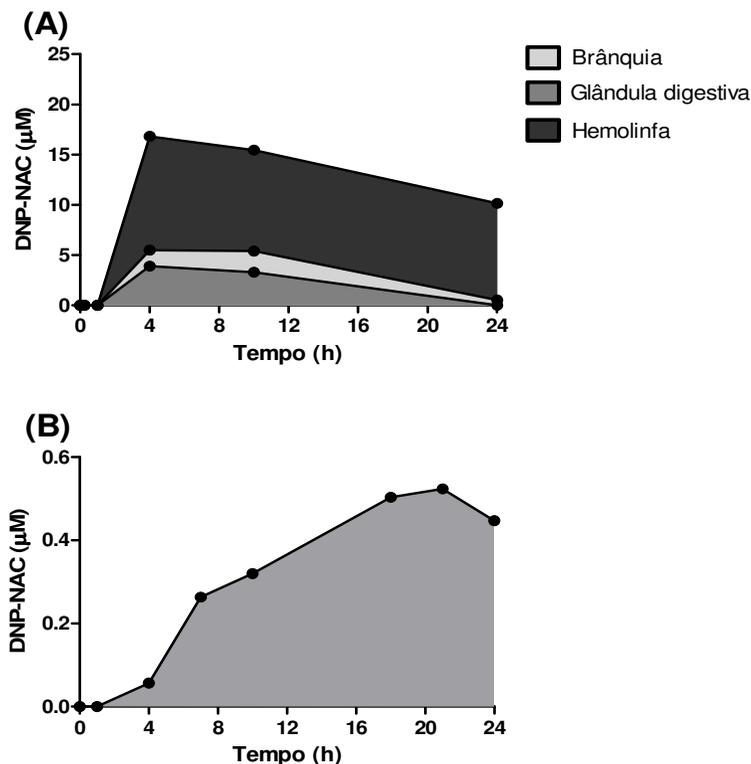


Figura 22: Níveis de 2,4-dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC) nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por 24 h. (A) Níveis de DNP-NAC na brânquia, glândula digestiva e hemolinfa. As amostras (100 µl) foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em 340 nm utilizando uma coluna de C18 e eluição isocrática, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:ácido acético (25:75%) com fluxo constante de 1ml/min. Dados estão representados como média (n = 3).

Entre os tecidos analisados, merece destaque a hemolinfa, onde os níveis de DNP-NAC foram de 16,8 μM após 4 h, enquanto que para a brânquia e a glândula digestiva foram de 5,5 e 3,9 μM neste mesmo período, respectivamente. Após 24 h de exposição, os níveis remanescentes de DNP-NAC estavam fora do limite de detecção para a glândula digestiva, 0,52 μM para a brânquia e 10,1 μM para a hemolinfa (Fig. 21A). Na água do mar, o DNP-NAC foi detectado a partir de 4 h de exposição, aumentando gradativamente ao longo do experimento chegando a níveis entre 0,4 e 0,5 μM a partir de 18 h de exposição (Fig. 22B).

A Tabela 3 resume os valores máximos atingidos por cada metabólito estudado nos tecidos e na água do mar, assim como o tempo de exposição correspondente a estes valores. O DNP-SG apresentou valores máximos na brânquia 7 vezes maiores que a glândula digestiva e 30 vezes maiores que a hemolinfa. O DNP-CYS apresentou o mesmo padrão, porém com diferenças menos evidentes entre os tecidos, com valores na brânquia 2 vezes maiores que na glândula digestiva e na hemolinfa. Ambos os compostos apresentaram valores máximos na brânquia e hemolinfa após 1 h de exposição, enquanto que na glândula digestiva o valor máximo foi atingido apenas após 4 h de exposição. No caso do DNP-NAC, a concentração máxima foi atingida na hemolinfa, com valores 4 vezes maiores que a brânquia e 32 vezes maiores que a glândula digestiva, todos após 4 h de exposição. Na água do mar, os valores máximos de DNP-NAC atingidos ao longo do experimento (21 h de exposição) foram, pelo menos, 6 vezes maiores que os de DNP-SG e DNP-CYS.

A Tabela 3 também aponta que, apesar de aparecerem rapidamente no organismo, o tempo de meia vida do DNP-SG e DNP-CYS é curto. No caso da brânquia, que foi o tecido com os maiores níveis destes metabólitos, este tempo ficou em 2,5 e 4,1 horas, enquanto que na glândula digestiva este valor foi aproximadamente 5 h. No caso da hemolinfa, os valores foram próximos da brânquia (~3 h). O DNP-NAC atingiu sua concentração máxima após 4 h de exposição em todos os tecidos analisados, enquanto que na água do valor foi após 21 h. O tempo de meia vida desse composto no tecido também foi mais elevado, entre 6 e 12 h. No caso da água do mar, como não houve decaimento de DNP-NAC, não foi possível calcular o seu tempo de meia vida.

Tabela 3: Visão geral dos níveis de metabólitos e seu tempo de permanência nos tecidos de ostras *Crassostrea gigas* e na água do mar durante exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 24 h.

Meta-bólito	Amostra	Concentração máxima (μM) ^a	Tempo para atingir a concentração máxima (h) ^b	Tempo de meia vida (h) ^c
CDNB	Água do mar	5,9	0	1,2
DNP-SG	Brânquia	215,5 \pm 59,9	1	2,5
	Hemolinfa	7,0 \pm 1,3	1	3,2
	Glândula digestiva	30,0 \pm 5,1	4	5,2
	Água do mar	0,08 \pm 0,09	10	n/c
DNP-CYS	Brânquia	330,8 \pm 47,4	1	4,1
	Hemolinfa	117,3 \pm 120,8	1	3,0
	Glândula digestiva	153,5 \pm 69,7	4	5,0
	Água do mar	0,07 \pm 0,09	18	n/c
DNP-NAC	Brânquia	5,5 \pm 4,8	4	12,3
	Hemolinfa	16,8 \pm 17,3	4	11,2
	Glândula digestiva	3,9 \pm 3,7	4	6,0
	Água do mar	0,52 \pm 0,07	21 h	n/c

a: concentração máxima em μM (média \pm desvio padrão) detectada para cada metabólito nos tecidos e água do mar.

b: tempo de exposição ao CDNB correspondente à máxima concentração detectada para cada metabólito.

c: cálculo do valor correspondente ao tempo de meia vida do composto nos tecidos após atingir a concentração máxima. A água do mar não apresentou decaimento que permitisse o cálculo da meia vida.

n/c: não calculado por não ocorrer diminuição do composto ao longo do experimento.

Ao olhar isoladamente cada metabólito (Anexo 1), a fim de comparar os níveis relativos destes composto em cada tecido em relação aos níveis totais encontrado para cada tempo (soma de todos os tecidos), vemos que o DNP-SG é encontrado preferencialmente na brânquia entre 15 min (97%) e 10 h (71%) de exposição, enquanto que ao final do experimento ele é encontrado preferencialmente na glândula digestiva (57%). A hemolinfa conta com baixos níveis deste composto (0 – 5%). No caso do DNP-CYS, o perfil é semelhante ao do DNP-SG, com destaque inicial para a brânquia (50 – 71% entre 15 min e 10 h), enquanto que ao fim do experimento é encontrado principalmente na glândula digestiva (50%). Porém, a hemolinfa merece um destaque para este composto, com valores representando 10 – 25% do total ao longo do experimento. O DNP-NAC apresentou uma distribuição predominante na hemolinfa ao longo de toda a exposição (65 – 95% do total).

Os dados também podem ser analisados individualmente para cada tecido (Anexo 2), a fim de comparar qual metabólito é encontrado preferencialmente em relação aos demais metabólitos. Na brânquia, o principal metabólito encontrado foi o DNP-CYS (55 – 71% do total), seguido do DNP-SG (42 - 44% do total). O DNP-NAC representa apenas 2 – 15% do total dos níveis totais de metabólitos encontrados neste tecido. Para a glândula digestiva, o DNP-CYS também foi o principal composto encontrado, com valores representando 68 - 84% do total. O DNP-SG foi o segundo composto encontrado preferencialmente neste tecido, com valores entre 16 – 32% do total. O DNP-NAC, assim como na brânquia, representou uma pequena fração dos metabólitos analisados, entre 2 – 7% do total. Já a hemolinfa foi caracterizada possuindo um perfil diferente dos demais tecidos, com o DNP-CYS sendo o principal metabólito nas primeiras 10 h de exposição (51 – 94% do total), enquanto que o DNP-NAC foi encontrado preferencialmente neste tecido ao fim do experimento (24 h, 89%) e também sendo o segundo principal composto após 10 h de exposição (48% do total). Os níveis de DNP-SG tiveram uma baixa representatividade neste tecido (máximo de 13% do total, após 15 min de exposição).

4.1.3. Efeitos do CDNB sobre o sistema antioxidante e sobre a enzima GST em *C. gigas*

Os dados apontam para um rápido consumo de GSH na brânquia tão cedo quanto 4 h de exposição (-60%), chegando a valores 87% menores após 24 h (Fig. 23A). O aumento da atividade GST foi detectada após 24 h (+75%, Fig. 23B), assim como as inibições das

enzimas GR (- 60% entre 10 e 24 h, Fig. 23C) e TrxR (-53% a partir de 4 h, Fig. 23D). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na glândula digestiva para estes parâmetros ao longo do período de exposição (Fig. 23). A atividade da GGT e níveis de TBARS permaneceram inalterados em ambos os tecidos para todos os tempos analisados (dados não apresentados).

Tendo em vista a rápida indução na atividade GST, os níveis dos transcritos de 3 isoformas de GST (omega, pi e mi) foram analisados na brânquia e glândula digestiva de ostras ao longo do experimento (4, 10 e 24h). Foi observado um rápido aumento no número de transcritos das isoformas omega (99 vezes, Fig. 24A) e pi (7 vezes, Fig. 24B) após 4 h de exposição nas brânquias, seguido do reestabelecimento nos níveis basais dos transcritos após 10 e 24 h. Na glândula digestiva, os níveis de transcritos da isoforma pi diminuíram aproximadamente 2,5 vezes após 10 h de exposição, porém retornaram ao normal após 24 h (Fig. 24B). Para as demais isoformas, os níveis de transcritos permaneceram inalterados ao longo do tempo na glândula digestiva. Também não foram observadas diferenças estatísticas para a GSTmi em ambos os tecidos (Fig. 24C), assim como para a Prx6 e GPx (dados não apresentados).

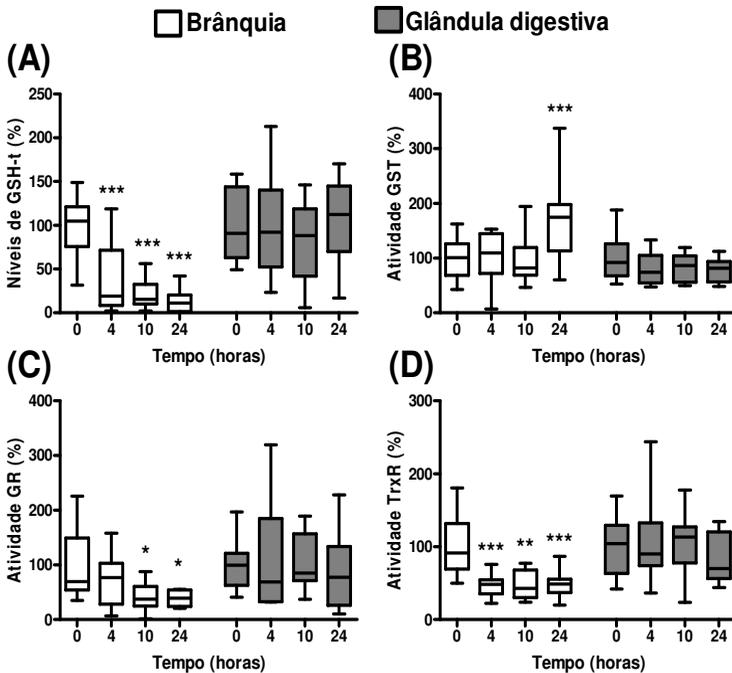


Figura 23: Níveis de glutatona total (GSH-t) e atividades enzimáticas em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 µM por até 24 h. (A) Níveis de GSH-t; atividade enzimática da (B) glutatona-S-transferase (GST); (C) glutatona redutase (GR); (D) tiorredoxina redutase (TrxR). Os dados estão apresentando na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos (n = 11 – 12). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan. Diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados são representadas como * ($p < 0,05$), ** ($< 0,01$) ou * ($p < 0,001$). Os valores absolutos (grupo controle, tempo zero horas) dos níveis de GSH-t foram de $0,44 \pm 0,15$ (brânquia) e $0,79 \pm 0,34$ µmol/g de peso úmido (glândula digestiva), para GST foram de $120,0 \pm 44,5$ (brânquia) e $76,5 \pm 36,2$ nmol/min/mg de proteína (glândula digestiva), para GR foram de $5,5 \pm 3,4$ (brânquia) e $14,9 \pm 7,3$ nmol/min/mg de proteína (glândula digestiva) e para a TrxR foram de $8,0 \pm 4,6$ (brânquia) e $3,7 \pm 1,5$ nmol/min/mg de proteína (glândula digestiva).**

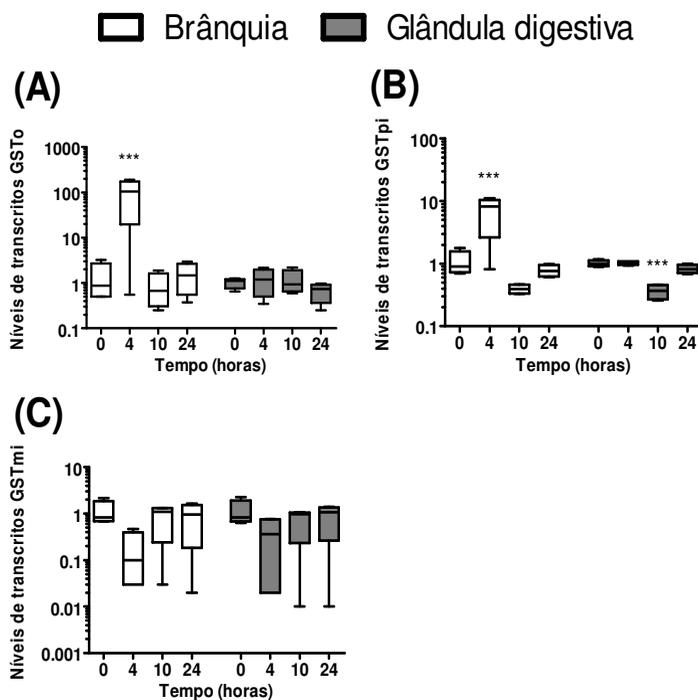


Figura 24: Níveis de transcritos de isoformas de glutationa S-transferase (GST) em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μM por até 24 h. (A) GST omega (GSTo); (B) GST pi (GSTpi); (C) GST mi (GSTmi). Os níveis foram normalizados em relação aos valores do grupo controle (0 h). Os dados estão apresentados em escala logarítmica na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos ($n = 4$). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan. Diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados são representadas como *** ($p < 0,001$).

4.1.4. Investigação do papel protetor da brânquia contra agentes eletrofílicos

Várias evidências apontam a brânquia como um alvo central dos efeitos do CDNB, entre elas: (a) a análise dos metabólitos da via do ácido mercaptúrico; (b) o depleção dos níveis de GSH-t; a (c) modulação da atividade das enzimas GST, GR e TrxR; e (d) aumento

nos níveis de transcritos de duas isoformas da enzima GST. Baseado nestas evidências, outros experimentos foram realizados a fim de investigar o papel protetor da brânquia contra agentes eletrofilicos em ostras *C. gigas*. Por estar em contato direto com o meio externo, a brânquia pode atuar como um importante local de biotransformação de fase II, evitando que agentes eletrofilicos atinjam os demais tecidos em elevadas concentrações. Em um primeiro experimento, diferentes doses de CDNB (0,3 – 3 μmol) foram injetadas no músculo adutor a fim de atingir o sistema circulatório. Através deste procedimento, foi hipotetizado que o papel das brânquias seria minimizado, uma vez que toda a superfície externa da brânquia não participaria como primeiro local de metabolização do CDNB. Desta forma, esperaria-se que os demais tecidos fossem afetados, uma vez que não contariam com a ação protetora inicial da brânquia. Os níveis de GSH-t e a atividade GST, GR e TrxR foram analisadas na brânquia e glândula digestiva após injeção de CDNB no músculo adutor. De maneira semelhante aos dados anteriores, em que a via de exposição foi a água do mar, a brânquia foi mais afetada. Foi detectado um consumo de GSH (30%, Fig. 25A), indução da GST (42%, Fig. 25B) e inibição da GR (52%, Fig. 25C) na dose de 3 μmol de CDNB somente na brânquia, assim como uma inibição de 31% da GR (Fig. 25C) na dose de 1 μmol neste mesmo tecido. A enzima TrxR não foi afetada neste tecido (Fig. 25D). No caso da glândula digestiva, foi detectada apenas a inibição da GR nas doses de 1 e 3 μmol (Fig. 25C).

Como forma de testar se o efeito da exposição na água do mar era específico para o CDNB e não a outros agentes eletrofilicos, ostras foram tratadas com um agente alquilante permeável (NEM) pela água do mar (afetando inicialmente a brânquia) ou por injeção no músculo adutor (a fim de atingir diretamente o sistema circulatório) e depletar os níveis de GSH (Fig. 26). Conforme esperado, os níveis de GSH-t diminuíram de maneira concentração-dependente na brânquia de animais expostos a NEM por ambas as vias de exposição (Fig. 26A e B). Por outro lado, o consumo de GSH-t ocorreu na glândula digestiva apenas quando as ostras foram expostas à NEM via hemolinfa, e apenas nas doses mais altas (100 e 300 μmol , Fig. 26B).

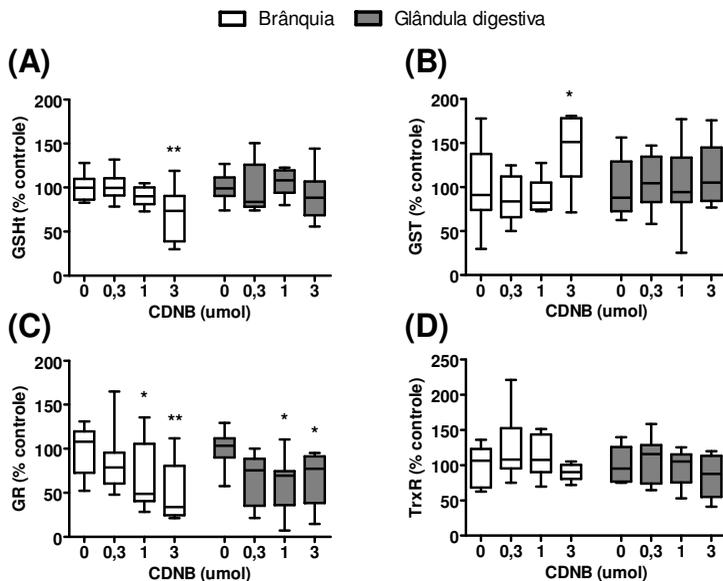


Figura 25: Níveis de glutatona total (GSH-t) e atividade enzimática em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas por 24 h a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) pelo sistema circulatório. Diferentes doses de CDNB foram injetadas no músculo adutor a fim de atingir diretamente a hemolinfa. (A) Níveis de GSH-t; (B) atividade glutatona-S-transferase (GST); (C) atividade glutatona redutase (GR); (D) atividade tiorredoxina redutase (TrxR). Os dados estão apresentados na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos (n = 8). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de duas vias seguido do *post hoc* de Duncan. Diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados são representadas como * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$). Os valores absolutos (grupo controle) dos níveis de GSH-t foram de $1,15 \pm 0,17$ (brânquia) e $1,21 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$ de peso úmido (glândula digestiva), para GST foram de $56,6 \pm 26,3$ (brânquia) e $17,3 \pm 6,15$ nmol/min/mg de proteína (glândula digestiva), para GR foram de $11,8 \pm 4,0$ (brânquia) e $11,2 \pm 2,4$ nmol/min/mg de proteína (glândula digestiva) e para a TrxR foram de $4,9 \pm 1,3$ (brânquia) e $2,6 \pm 0,5$ nmol/min/mg de proteína (glândula digestiva).

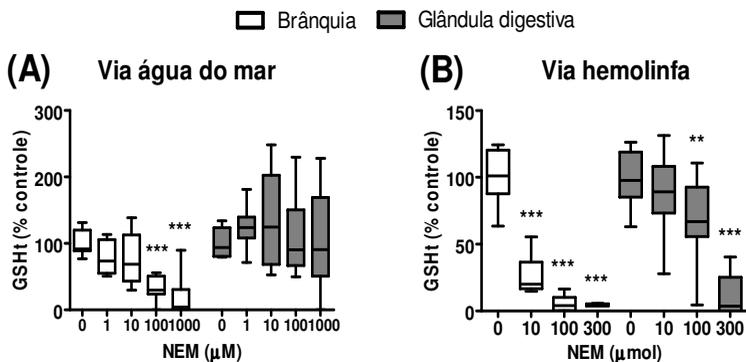


Figura 26: Níveis de glutatona total (GSH-t) em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas por 1 h ao agente eletrofílico N-etilmaleimida (NEM) via água do mar ou via hemolinfa. (A) NEM (1 – 1000 μM) foi adicionada na água do mar ou (B) NEM (10 – 300 μmol) foi injetada no músculo adutor para atingir diretamente a hemolinfa. Os dados estão apresentados na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos ($n = 4 - 12$). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan. Diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados são representadas como ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Os valores absolutos (grupo controle) dos níveis de GSH-t foram de $1,00 \pm 0,25$ (brânquia) e $1,44 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/g}$ de peso úmido (glândula digestiva).

Um terceiro experimento investigou se a depleção de GSH causada pela NEM via água do mar (Fig. 27) poderia permitir uma maior queda nos níveis de GSH após uma exposição ao CDNB. Nesta situação, a brânquia poderia estar incapacitada de realizar a biotransformação de fase II deste composto pela falta de GSH intracelular. Como consequência, o CDNB poderia atingir a glândula digestiva. A análise dos níveis de GSH-t na brânquia indicou que animais expostos a NEM (100 μM) por 1 h seguido de 24 h de depuração em água do mar reestabeleceram os níveis basais de GSH-t. Conforme o esperado, animais expostos a CDNB 10 μM (com ou sem pré-exposição a NEM) apresentaram níveis de GSH-t entre 80 e 90% menores que o controle. No caso da glândula digestiva, na qual, anteriormente, os níveis de GSH-t não foram afetados pela exposição ao CDNB ou à NEM via água do mar (Fig. 23A e 26A), foi detectado um

consumo de 34% nos níveis de GSH-t intracelular após a pré-exposição a NEM seguido de CDNB (Fig. 27). Novamente, nem a exposição ao CDNB ou à NEM *per se* causaram efeitos nos níveis de GSH-t da glândula digestiva (Fig. 27).

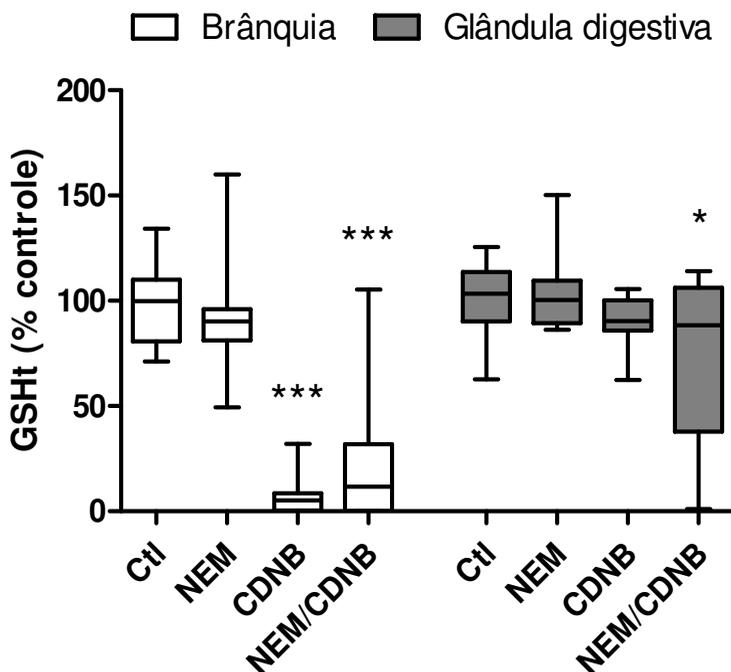


Figura 27: Níveis de glutatona total (GSH-t) em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* pré-expostas a N-etilmaleimida (NEM) por 1 h seguido de exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 24 h. NEM (100 μ M) foi adicionada na água do mar e após 1 h os animais foram expostos a CDNB 10 μ M (grupo NEM/CDNB) ou mantidas depurando em água do mar (grupo NEM) por 24 h. Um terceiro grupo foi exposto somente a CDNB por 24 h (grupo CDNB), enquanto que um grupo controle (Ctl) foi mantido sempre em água do mar. Os dados estão apresentados na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos (n = 12). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de duas vias seguido do *post hoc* de Duncan. Diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados são representadas como * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$). Os valores absolutos (grupo controle) dos níveis de GSH-t foram de $0,87 \pm 0,15$ (brânquia) e $1,32 \pm 0,18$ μ mol/g de peso úmido (glândula digestiva),

4.2. ESTUDO 2

4.2.1. Efeitos do $ZnCl_2$ e CDNB sobre as enzimas auxiliares GR e TrxR em mexilhões e ostras

O sistema antioxidante de mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas* foi afetado através da utilização de $ZnCl_2$ e CDNB como agentes depletoras das atividades das enzimas GR e TrxR na brânquia. No caso de mexilhões *P. perna*, diferentes concentrações de $ZnCl_2$ (30 – 100 μM) e CDNB (3 – 25 μM) foram utilizadas num protocolo de 18 h de exposição (Fig. 28). $ZnCl_2$ causou inibição de ambas enzimas de uma maneira concentração-dependente: 40 μM causou aproximadamente 30% de inibição da GR, enquanto que concentrações mais altas quase aboliram sua atividade (Fig. 28A). A atividade da TrxR também foi sensível à exposição a $ZnCl_2$, apresentando inibição de 48 e 78% após exposição a 50 e 100 μM (Fig. 28B).

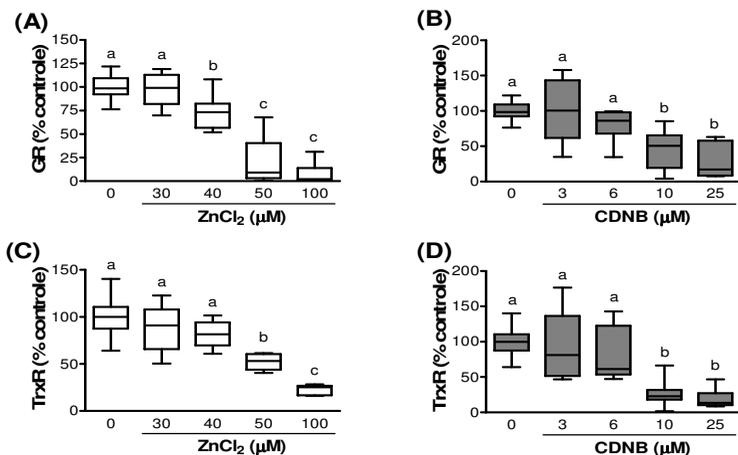


Figura 28: Atividades enzimática da glutationa redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR) em brânquias de mexilhões *Perna perna* expostos a $ZnCl_2$ ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) durante 18 h. Atividade da GR em animais expostos a $ZnCl_2$ (A) ou CDNB (B), atividade da TrxR em animais expostos a $ZnCl_2$ (C) ou CDNB (D). Os dados são apresentados como boxplot contendo a mediana, o primeiro (25%) e terceiro quartil (75%) e os desvios representando os valores mínimos e máximos (n = 6 – 39). Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan, e grupos não compartilhando letras apresentam diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$). Os valores absolutos da atividade da GR e TrxR foram de 75.4 ± 14.5 e 23.6 ± 6.2 nmol/min/g de proteína, respectivamente.

O CDNB causou inibição da GR (54%) e TrxR (73%) apenas a partir da concentração de 10 μM , e com efeitos semelhantes para 25 μM (Fig. 28C e D). A atividade da enzima GPx não foi afetada pelo agentes testados (dados não apresentados).

Baseado nestes resultados, as concentrações de 40 μM (ZnCl_2) e 10 μM (CDNB) foram escolhidas para experimentos adicionais com mexilhões *P. perna*. Nestas concentrações, ZnCl_2 afetou apenas a atividade da GR (-28%), e consequentemente o ciclo da GPx, enquanto o CDNB afetou ambas as enzimas GR (-54%) e TrxR (-73%), possivelmente afetando os sistemas da GPx e Prx.

De maneira semelhante, foi utilizado CDNB (10 μM por 18 h) como inibidor do sistema antioxidante em ostras *C. gigas*. Novamente, foi confirmada a menor atividade das enzimas GR (-40%) e TrxR (-60%) (Fig. 29A e 29B).

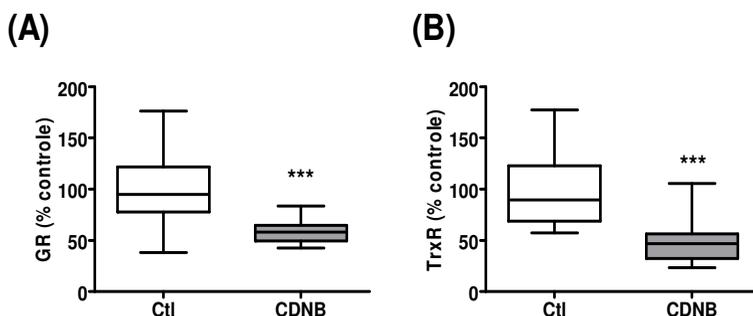


Figura 29: Atividades enzimáticas da glutathiona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR) em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) durante 18 h. Atividade da (A) GR e (B) TrxR. Os dados são apresentados como boxplot contendo a mediana, o primeiro (25%) e terceiro quartil (75%) e os desvios representando os valores mínimos e máximos (n = 9). Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste t de Student e representadas como *** ($p < 0,001$). Os valores absolutos da atividade da GR e TrxR foram de $13,19 \pm 5,22$ e $7,20 \pm 2,75$ nmol/min/mg de proteína, respectivamente.

4.2.2. Efeitos do ZnCl_2 e CDNB na susceptibilidade de mexilhões e ostras a CHP e Men

Um desafio oxidativo foi realizado com mexilhões através da exposição a CHP (0 – 3000 μM) e a sobrevivência dos animais foi

avaliada ao longo de 96 h (Fig. 30A). A toxicidade foi estimada através da determinação da CL_{50} (96 h), com um valor de aproximadamente 550 μM (Fig. 30B). A fim de investigar os efeitos protetores das enzimas GR e TrxR, mexilhões pré-expostos a ZnCl_2 (40 μM) e CDNB (10 μM) por 18 h foram expostos a CHP (100 e 300 μM) por 96 h, e a taxa de sobrevivência foi comparada com animais controle expostos a CHP (Fig. 30C – F). Nestas concentrações de peróxido foi observada uma mortalidade de 22 e 42% (100 e 300 μM , respectivamente). ZnCl_2 e CDNB aumentaram esta taxa entre 2 e 4 vezes, com o CDNB causando maiores efeitos. Ambos os compostos, quando aplicados isoladamente, não causaram mortalidade para mexilhões na ausência de peróxido (dados não apresentados).

Os efeitos da inibição da GR e da TrxR também foram avaliados *in vivo* através da análise da capacidade de detoxificação de peróxidos exógenos. Na ausência de animais, os níveis de CHP se mantiveram estáveis na água do mar durante o experimento (Fig. 31A). Análise dos níveis de CHP na água do mar foi feita durante uma exposição por 2 h. Mexilhões expostos a CHP (50 μM) apontaram para um tempo de meia vida do peróxido de aproximadamente 25 min (Fig. 31A). No caso de animais pré-expostos a ZnCl_2 ou CDNB, este valor aumentou pelo menos 60% (Fig. 31B e C). A fim de melhor estimar a capacidade de detoxificação de peróxido pelos organismos, o valor da AAC foi determinada individualmente e comparada com animais controle (100%). O pré-tratamento de ZnCl_2 causou um aumento de 44% na AAC (Fig. 31D), enquanto que o CDNB aumentou este valor em 108% (Fig. 31D). Resultados semelhantes foram observados em animais expostos a CHP 100 μM , porém com efeitos menos proeminentes do ZnCl_2 e do CDNB na AAC (33 e 55% de aumento, respectivamente (dados não apresentados).

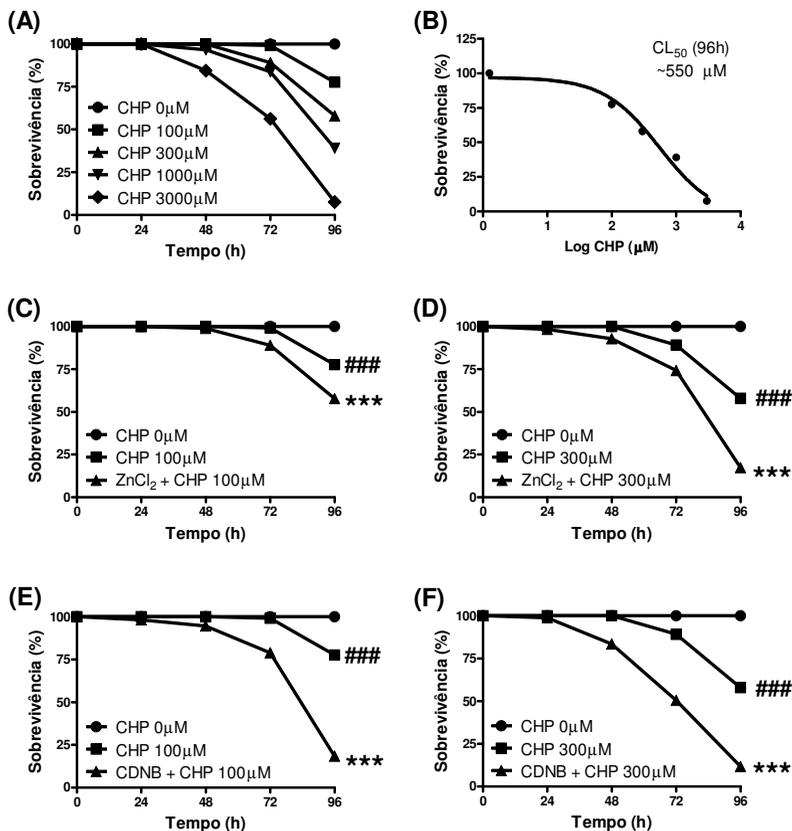


Figura 30: Efeitos dos inibidores $ZnCl_2$ ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na sobrevivência de mexilhões *Perna perna* expostos a hidroperóxido de cumeno (CHP). (A) Animais foram expostos por 96h a diferentes concentrações de CHP a fim de estimar a toxicidade deste composto; (B) Análise da $CL_{50}(96h)$ de CHP; (C e D) animais previamente expostos a $ZnCl_2$ 40 μM por 18 h foram expostos a CHP 100 e 300 μM ; (E e F) animais previamente expostos a CDNB 10 μM por 18 h foram expostos a CHP 100 e 300 μM por 96h. Não foi observada mortalidade em animais expostos a $ZnCl_2$ ou CDNB por 18 h em seguida de 96 h em água do mar. As curvas de sobrevivência foram desenhadas a partir da análise de PROBIT e as comparações foram realizadas pelo teste de Mantel-Cox ($n = 12$). Diferenças estatísticas entre o grupo controle e animais expostos a CHP estão representados como ### ($p < 0,001$). Diferenças estatísticas entre o grupo CHP e $ZnCl_2$ /CDNB + CHP estão representadas como *** ($p < 0,001$).

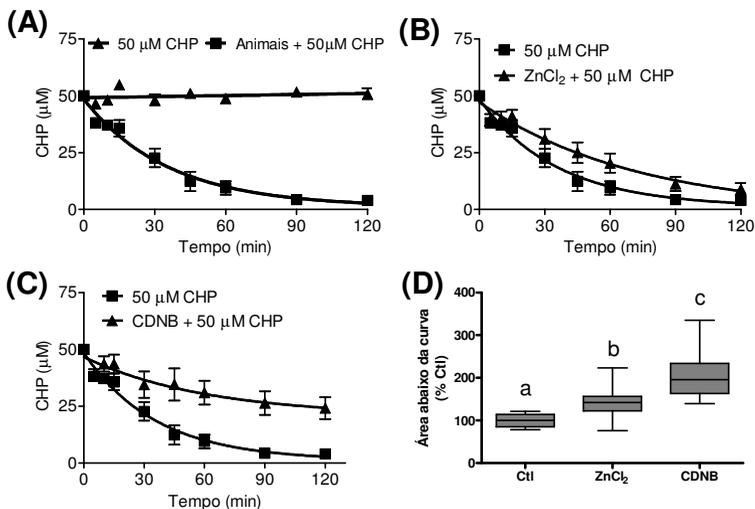


Figura 31: Efeitos da exposição a ZnCl₂ ou a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na taxa de detoxificação de peróxido exógeno *in vivo* em mexilhões *Perna perna* expostos a hidróperóxido de cumeno (CHP). Animais foram expostos a CHP 50 μM por 2 h e os níveis de CHP foram analisados na água do mar ao longo do tempo. (A) Taxa de detoxificação de CHP por animais controle (não tratados com ZnCl₂ ou CDNB) ou auto-decomposição do CHP na ausência de animais; gráficos comparando a taxa de detoxificação por animais controle ou por animais pré-expostos a (B) ZnCl₂ 40 μM ou (C) CDNB 10 μM por 18 h; (D) Cálculo da área abaixo da curva (AAC) de gráficos representando a taxa de detoxificação de CHP e comparação dos valores da AAC entre grupos controle, pré-expostos a ZnCl₂ ou CDNB. A AAC foi normalizada para 100 % para o grupo controle. Dados estão representados como média ± erro padrão médio para a taxa de detoxificação ou como boxplot contendo a mediana, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartil, e os desvios representam os valores mínimos e máximos (n = 10 – 12). Grupos não compartilhando letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$), sendo que as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan.

A fim de confirmar se a inibição da GR e TrxR causada pelo CDNB em ostras também poderia afetar a capacidade antioxidante do organismo, ostras foram pré-expostas a CDNB seguido de CHP ou Men. A capacidade de detoxificar CHP foi analisada através da quantificação dos níveis de CHP na água do mar ao longo de 2 h (Fig. 32A). A taxa de eliminação do CHP da água do mar foi de aproximadamente 6,8 μmol/h/animal para animais controle e 4,7 μmol/h/animal para ostras

pré-tratadas com CDNB. Resultados semelhantes foram obtidos em animais pré-expostos a CDNB e expostos a Men 300 μM : a mortalidade de ostras expostas a Men aumentou de 17% para 67% após 96 h de tratamento em animais sob efeitos da pré-exposição à CDNB (Fig. 32B).

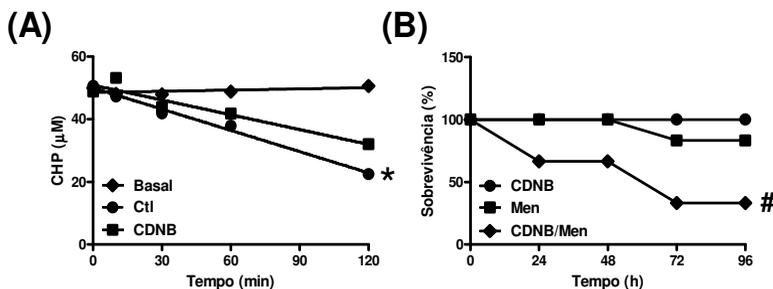


Figura 32: Efeitos da pré-exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na capacidade de detoxificação de peróxidos exógenos e na mortalidade induzida por menadiona (Men) em ostras *Crassostrea gigas*. (A) Após exposição a CDNB 10 μM por 18 h, os animais foram expostos a peróxido de cumeno (CHP 50 μM) por 2 h e os níveis de CHP foram medidos na água do mar ao longo do tempo. O experimento também foi realizado com animais não expostos a CDNB (Ctl) e a taxa de decomposição espontânea do CHP também foi medida na ausência de animais (basal). (B) A mortalidade de ostras foi analisada em animais expostos a CDNB 10 μM por 18 h seguido da permanência na água do mar livre de CDNB por 96 h (grupo CDNB) ou seguido de Men 0,3 mM por 96 h (grupo CDNB/Men). Um terceiro grupo de ostras foi exposto apenas a Men 0,3 mM por 96 h (grupo Men). Não foi observada mortalidade no grupo controle. Regressões lineares foram calculadas para estimar e comparar as diferentes taxas de degradação de peróxido ($n = 9 - 10$). As curvas de sobrevivência foram desenhadas a partir da análise de PROBIT e as comparações foram realizadas pelo teste de Mantel-Cox ($n = 6$). Diferença estatística entre as regressões lineares para os grupos Ctl e CDNB está representada como * ($p < 0,05$) e entre as curvas de mortalidade para os grupos CDNB/Men e Men como # ($p < 0,05$).

A fim de conferir se o CDNB era capaz de afetar enzimas relacionadas a metabolização da Men, e conseqüentemente afetando sua toxicidade de maneira independente ao sistema antioxidante, foram analisadas a atividade das enzimas Men redutase (conhecida como DT-diaforase) e a NAD(P)H citocromo c redutase. Estas são duas das enzimas responsáveis pelo processo de biotransformação de quinonas,

através da redução de quinonas por dois ou um elétron, respectivamente. A redução de Men pelo extrato citosólico foi acompanhada na presença de NADPH como fonte de agentes redutores (Fig. 33A), e na presença ou ausência de um inibidor da DT-diaforase (dicumarol). Foi observado que, mesmo na presença de dicumarol, a redução de Men ocorreu sem nenhuma alteração significativa na taxa de consumo de NADPH, indicando que este metabolismo é independente da via de dois elétrons.

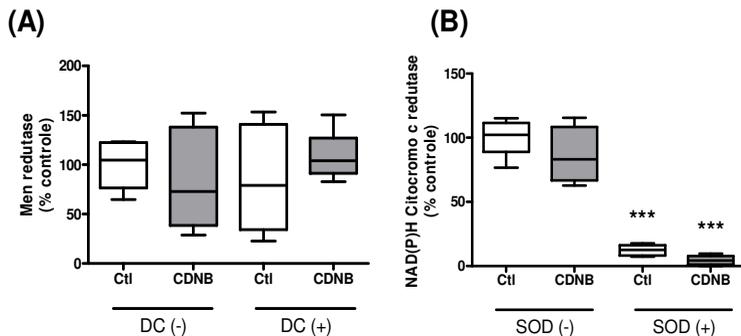


Figura 33: Atividades enzimática da menadiona redutase (Men redutase) e NAD(P)H citocromo C reductase em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* após exposição a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μ M por 18 h. Atividade da (A) Men redutase na presença ou não do inibidor da redução por dois elétrons dicumarol (DC) e (B) NAD(P)H citocromo c reductase na presença ou não do inibidor da redução por um elétron superóxido dismutase (SOD). Os dados são apresentados como boxplot contendo a mediana, o primeiro (25%) e terceiro quartil (75%) e os desvios representando os valores mínimos e máximos ($n = 6$). Os dados foram analisados ANOVA de duas via seguido do teste *post hoc* de Duncan e as diferenças significativamente estatísticas entre a atividade total e a atividade na presença dos inibidores são apresentadas como *** ($p < 0,001$). Os valores absolutos da atividade da Men redutase e citocromo c reductase foram de $3,50 \pm 0,88$ e $5,83 \pm 0,80$ nmol/min/mg de proteína, respectivamente.

A redução da Men por um elétron foi confirmada através da enzima NAD(P)H citocromo c reductase (Fig. 33B) e a utilização de SOD purificada. Durante este processo de redução mediada pela enzima ocorre a geração de $O_2^{\cdot-}$, conforme descrito na seção 1.2. Este radical pode reduzir o citocromo C presente no ensaio enzimático. A adição de SOD ao ensaio praticamente aboliu a redução do citocromo C, indicando a formação de $O_2^{\cdot-}$ gerado pela enzima NAD(P)H citocromo c

reduz-se na presença de Men. A pré-exposição ao CDNB não afetou a atividade de ambas as enzimas relacionadas ao metabolismo de quinonas.

4.2.3. Efeitos do $ZnCl_2$ e CDNB sobre o estado tiólico de mexilhões e ostras expostas ao CHP ou à Men

O estado tiólico intracelular da brânquia de mexilhões também foi analisado a fim de investigar os efeitos da exposição a CHP, na presença ou ausência de $ZnCl_2$ e CDNB. No caso dos níveis de GSH-t e PSH, foi detectado um aumento de 20-25% (GSH-t) ou 30% (PSH) em mexilhões sob desafio oxidativo mediado por CHP por 2 h (Fig. 34A e C). A pré-exposição a $ZnCl_2$ ou CDNB bloqueou este aumento, além da exposição a CDNB depletar os níveis de GSH-t. Ao contrário do esperado, não houve acúmulo de GSSG durante a exposição a CHP, na presença ou ausência dos inibidores (Fig. 34B). O CDNB também causou depleção nos níveis de GSSG intracelulares (Fig. 34B).

No caso de ostras *C. gigas*, assim como observado no Estudo 1 (Fig. 23), a exposição a CDNB 10 μ M por 24 h causou consumo nos níveis de GSH-t (53%, dados não apresentados) e diminuição nos níveis de PSH (25%, dados não apresentados). Apesar de o CDNB causar consumo nos níveis de -SH intracelulares, uma depuração de 24 h após o tratamento permite o restabelecimento destes níveis (Fig. 35A e B, grupo CDNB/AM). A exposição de ostras a Men 1 mM não causou alterações nesses parâmetros, porém o efeito sinérgico da pré-exposição a CDNB seguido da exposição a Men causa depleção dos níveis de GSH-t (Fig. 35A) e bloqueia o reestabelecimento dos níveis de PSH (Fig. 35B).

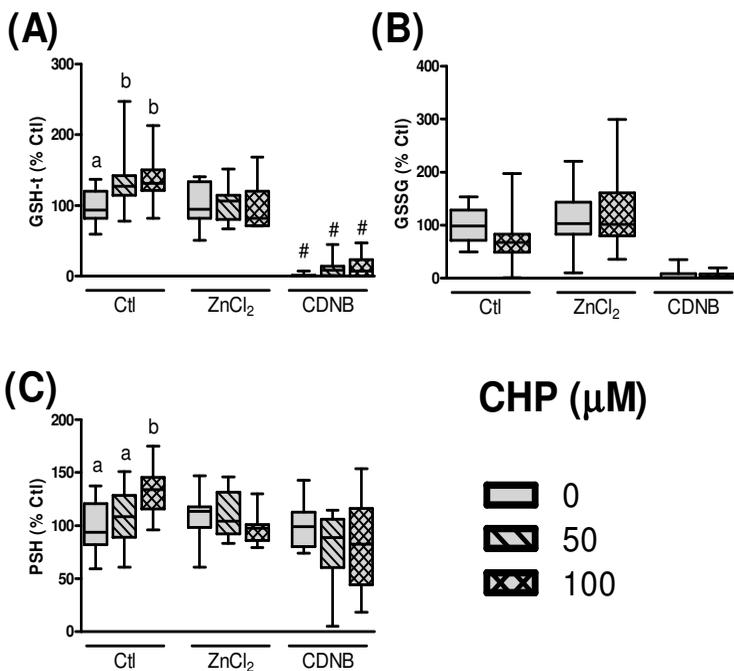


Figura 34: Efeitos da exposição à ZnCl₂ ou à 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) sobre o estado tiólico de brânquia de mexilhões *Perna perna* expostos a hidroperóxido de cumeno (CHP). Animais foram expostos CHP 50 ou 100 μM por 2 h e os parâmetros foram avaliados nas brânquias. Animais pré-expostos a ZnCl₂ 40 μM ou CDNB 10 μM também foram expostos a CHP e analisados. Níveis de (A) glutatona total (GSH-t), (B) dissulfeto de glutatona (GSSG), (C) tióis proteicos (PSH). Dados estão representados como boxplot contendo a mediana, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartil, e os desvios representam os valores mínimos e máximos. Para cada pré-exposição (Ctl, ZnCl₂ ou CDNB), grupos com letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Diferenças de grupos pré-expostos a CDNB em relação ao grupo controle são representadas como # ($p < 0,001$). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA de duas vias seguido do *post hoc* teste de Duncan. Os valores absolutos (média ± desvio padrão) dos animais controle (Ctl) são GSH-t 0,44 ± 0,03 (μmol/g peso úmido), PSH 1,81 ± 0,07 (μmol/g peso úmido) e GSSG 51,45 ± 6,28 (nmol/g peso úmido).

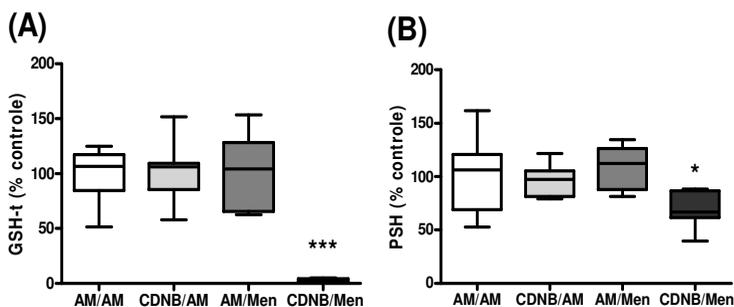


Figura 35: Níveis de tióis em brânquia de ostras *Crassostrea gigas* expostas à 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e/ou à menadiona (Men). Animais foram expostos à CDNB 10 μM por 18 h seguido de exposição a água do mar por 24 h (CDNB/AM) ou Men 1 mM (CDNB/Men). Um terceiro grupo foi exposto apenas a Men 1 mM por 24 h (AM/Men), além da presença de um grupo controle mantido sempre em água do mar (AM/AM). (A) Glutathiona total (GSH-t); (B) tióis proteicos (PSH). Os dados são apresentados como boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios mostrando os valores mínimos e máximos ($n = 8 - 10$). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Duncan e estão indicados como * ($p < 0,05$) ou *** ($p < 0,001$). Os valores absolutos (média \pm desvio padrão) dos animais controle (AM/AM) são GSH-t $0,57 \pm 0,13$ ($\mu\text{mol/g}$ peso úmido) e PSH $1,76 \pm 0,60$ ($\mu\text{mol/g}$ peso úmido).

4.2.4. Efeitos do ZnCl_2 e CDNB em hemócitos de mexilhões e de ostras expostas ao CHP ou à Men

Em mexilhões, os efeitos do pré-tratamento com ZnCl_2 e CDNB, os quais refletem uma menor capacidade de detoxificação de peróxido, também foram investigados através da análise de parâmetros celulares e de imunocompetência em hemócitos. Os dados indicam que, apesar do ZnCl_2 ou CHP não afetarem a densidade celular destas células na hemolinfa, animais expostos a ambos compostos apresentaram um aumento de 92% na densidade celular de hemócitos circulantes (Fig. 36A), indicando um efeito sinérgico do ZnCl_2 e CHP. A viabilidade celular, estimada pelo ensaio do MTT (Fig. 36B) e do VN (dados não apresentados), não foi afetada por ambos os compostos sozinhos ou em conjunto (Fig. 36B). No caso do CDNB, foi detectada uma diminuição na viabilidade celular de hemócitos de organismos pré-expostos a CDNB seguido de uma exposição a CHP 100 μM por 2 h (Fig. 36B). A densidade celular de hemócitos circulantes ou a viabilidade celular

estimada pelo ensaio do VN não foram afetadas em animais pré-tratados ao CDNB seguido de exposição à CHP.

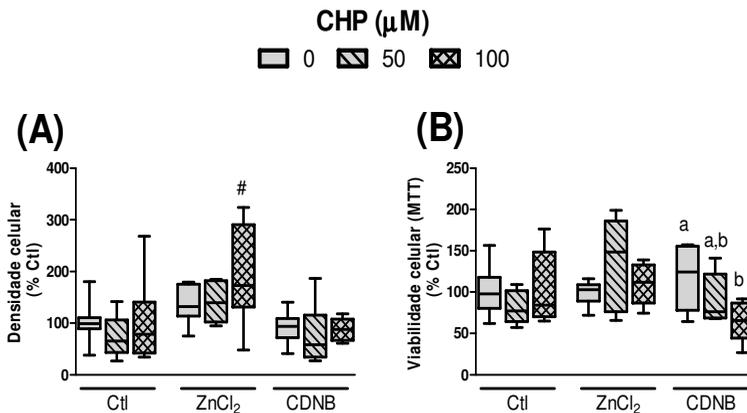


Figura 36: Efeitos da exposição ao ZnCl₂ ou ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) sobre a densidade celular e viabilidade celular de hemócitos circulantes de mexilhões *Perna perna* expostos a hidroperóxido de cumeno (CHP). Animais foram expostos à CHP 50 ou 100 μM por 2 h e os parâmetros foram avaliados em hemócitos após coleta da hemolinfa. Animais pré-expostos a ZnCl₂ 40 μM ou CDNB 10 μM também foram expostos ao CHP e, em seguida, analisados. (A) Densidade celular; (B) viabilidade celular estimada pelo método do MTT. Dados estão representados como boxplot contendo a mediana, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartil, e os desvios representam os valores mínimos e máximos (n = 5 – 15). Grupos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Diferenças com relação ao grupo controle não expostos a CHP são indicadas com # ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA de duas vias seguido do *post hoc* de Duncan. Os valores absolutos (média ± desvio padrão) da densidade celular para os animais controle foi de $3,26 \pm 0,30 \times 10^6$ células/ml.

No caso de ostras, além dos efeitos na capacidade de degradar peróxidos e no aumento da mortalidade induzida por Men, o CDNB também foi capaz de causar distúrbios nas células do sistema imunológico de *C. gigas*. A exposição de ostras a CDNB por 18 h seguido de 24 h de depuração causa uma diminuição na viabilidade celular, detectado pelo ensaio do vermelho neutro (Fig. 37B), e um aumento nos danos ao DNA em hemócitos (Fig. 37C). Este mesmo efeito foi detectado em animais pré-tratados com CDNB seguido de exposição a Men, apesar de que o tratamento com Men *per se* não causa

nenhum efeito sobre a viabilidade dos hemócitos (Fig. 37A e B). Todos os tratamentos aumentaram os danos ao DNA quando comparado ao grupo controle (Fig. 37C), além de aumentar a frequência de células com categoria de dano de 1 – 4 (de 52% do AM/AM para 80-90% para os demais grupos).

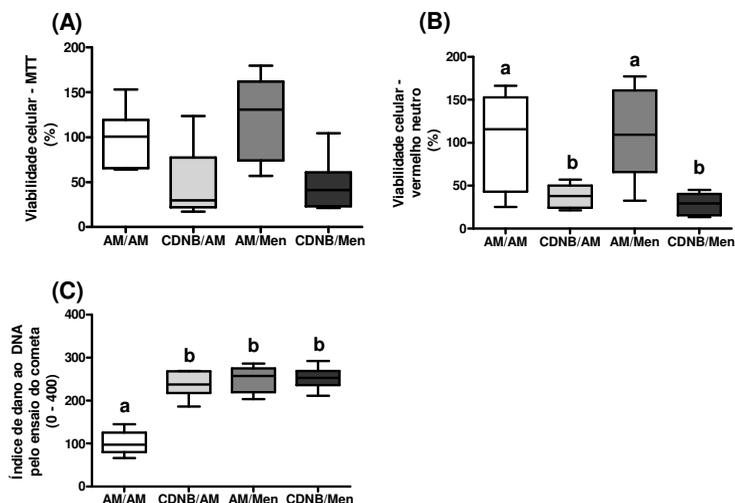


Figura 37: Viabilidade celular e dano ao DNA em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* expostas ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e/ou à menadiona (Men). Animais foram expostos a CDNB 10 μ M por 18 h seguido de exposição à água do mar por 24 h (CDNB/AM) ou Men 1 mM (CDNB/Men). Um terceiro grupo foi exposto apenas a Men 1 mM por 24 h (AM/Men), além da presença de um grupo controle mantido sempre em água do mar (AM/AM). (A) Viabilidade celular pelo ensaio mitocondrial da redução do MTT; (B) viabilidade celular pelo ensaio da estabilidade lisossomal utilizando o corante vermelho neutro; (C) quantificação dos níveis de danos ao DNA utilizando o ensaio do cometa. Os dados são apresentados como boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios mostrando os valores mínimos e máximos ($n = 6 - 10$). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Duncan. Grupos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

4.3. ESTUDO 3

4.3.1. Caracterização das ZnONP.

As ZnONP foram caracterizadas por dois diferentes ensaios: MET e espalhamento dinâmico da luz. As imagens de MET indicam que

as ZnONP apresentam formato arredondado, com diâmetro médio de $31,7 \pm 13,0$ nm (Fig. 38A) para as partículas primárias, apesar de se agregarem na água do mar (Fig. 38D). A análise de espalhamento dinâmico da luz indicou diferentes padrões de tamanho de acordo com o meio utilizado: em DMSO (Fig. 38B) o tamanho médio do diâmetro variou entre 28,6, 29,9 e 88,5 nm para as concentrações testadas (8, 16 e 32 mg/L). Entretanto, na água do mar (Fig. 38C) o tamanho do diâmetro aumentou para a escala micrométrica (1,02 e 2,05 μm para as concentrações de 8 e 16 mg/L). Uma alta taxa de agregação foi observada na concentração de 32 mg/L, inviabilizando uma análise acurada por espalhamento dinâmico da luz.

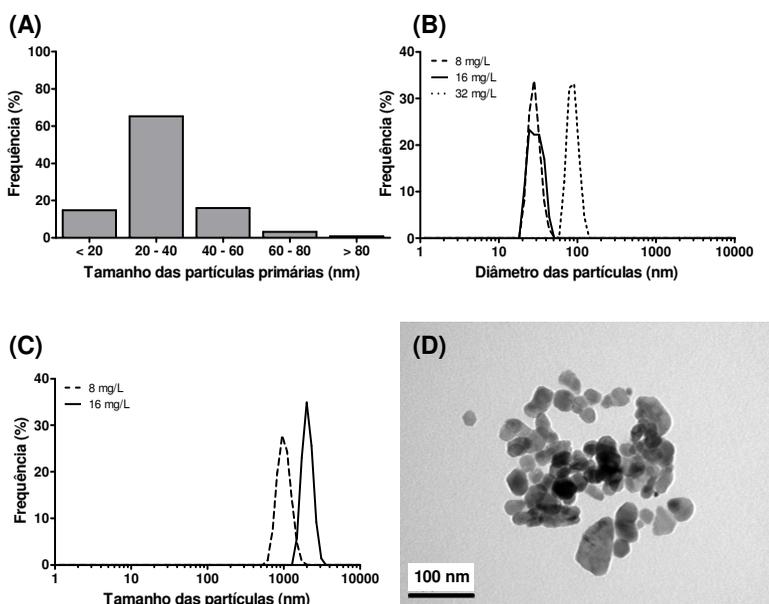


Figura 38: Caracterização de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP). (A) Distribuição do tamanho das partículas primárias de ZnONP em água do mar após análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET). (B) Distribuição do tamanho das partículas de ZnONP (8, 16 e 32 mg/L) em DMSO por análise de espalhamento dinâmico da luz. (C) Distribuição do tamanho das partículas de ZnONP (8 e 16 mg/L) em água do mar por análise de espalhamento dinâmico da luz. (D) Imagem representativa de ZnONP em água do mar obtida por MET, destacando o padrão de agregação dessas nanopartículas.

4.3.2. Ensaios de toxicidade aguda com ZnONP e ZnCl₂ com ostras *C. gigas*

A toxicidade aguda das ZnONP para as ostras *C. gigas* foi investigada por um experimento de sobrevivência por 96 h (Fig. 39A). Apesar de não ter sido possível detectar uma concentração capaz de causar 100% de letalidade, foi possível estimar a CL₅₀(96 h) em aproximadamente 37,2 mg/L de ZnONP (Fig. 39C).

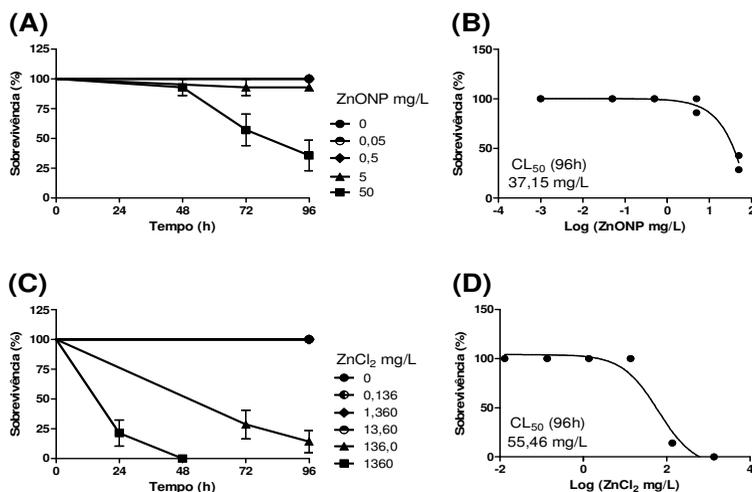


Figura 39: Teste de toxicidade aguda em ostras *Crassostrea gigas* expostas à nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e ZnCl₂. Animais foram expostos a diferentes concentrações de ZnONP e ZnCl₂ por 96 h. A taxa de sobrevivência foi analisada no início de cada dia. (A) Gráfico representando a análise de PROBIT de *C. gigas* expostas a ZnONP, (B) determinação da CL₅₀(96 h) baseada nos dados de sobrevivência, (C) gráfico representando as análises de PROBIT de *C. gigas* expostas a ZnCl₂, (D) determinação da CL₅₀(96 h) baseada nos dados de sobrevivência. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n = 12).

Para efeitos comparativos, esta concentração corresponde a 29,9 mg/L de zinco. Outro experimento de sobrevivência foi realizado para comparar a toxicidade de ZnONP com aquela causada por ZnCl₂ (Fig. 39B): este último demonstrou uma CL₅₀(96 h) de 55 mg/L (Fig. 39D) para o ZnCl₂, correspondendo a 26,6 mg/L de zinco.

4.3.3. Quantificação dos níveis de zinco e análises de microscopia eletrônica

Baseado nos dados de sobrevivência, foi utilizada a concentração de 4 mg/L de ZnONP (aproximadamente 10% da Cl_{50}) como uma concentração subletal para experimentos envolvendo análises químicas, bioquímicas e celulares. Um experimento inicial foi realizado para observar o perfil de absorção de ZnONP e os alvos celulares dessas nanopartículas em brânquias e glândulas digestivas. Ostras foram expostas a ZnONP 4 mg/L e análises de zinco total foram realizadas na água do mar e nos tecidos após 6, 24 e 48 h, assim como análises por microscopia eletrônica nos tecidos.

Os níveis iniciais de zinco total na água do mar (Fig. 40A) variaram entre 2,4 e 2,9 mg/L, sendo esperado um valor de 3,2 mg/L para esta concentração de nanopartículas. Desta forma, apesar de estar aproximadamente 10 – 25% abaixo do esperado, este foi considerado aceitável para o propósito deste estudo. Os níveis de zinco total diminuíram 25 – 35% dentro de 24 h na presença ou ausência de animais (Fig. 40A). Este dado, em conjunto com a observação de uma camada de finas partículas no fundo dos aquários indicam uma possível precipitação de ZnONP ao longo do tempo, possivelmente devido ao padrão de agregação na água do mar.

Também foi testado se as ZnONP dissociam-se em zinco iônico (Zn^{2+}) na água do mar durante 24 h (Fig. 40B). Alíquotas de água do mar com ZnONP 4 mg/L foram coletadas nos tempos zero, 6 e 24 h, e filtradas em membranas com ponto de exclusão de 10 kDa (equivalente a nanopartículas de tamanho de 2 nm ou maior). No tempo 0 h, foi observado que os níveis de zinco iônico corresponderam a 38% do valor do zinco total na água do mar, aumentando para 51 e 78% após 6 e 24 h. Estes dados indicam uma rápida dissociação de ZnONP, dentro de alguns minutos, seguido de um processo mais demorado (horas).

Os níveis de zinco total também foram quantificados em brânquias e glândula digestiva de ostras nos tempos 0, 6, 24 e 48 h de exposição (Fig. 40C). Os níveis basais de zinco foram aproximadamente 2 vezes maiores na brânquia que na glândula digestiva, com um aumento de 49 e 80% nos valores de zinco nas brânquias após 24 e 48 h de exposição, enquanto que na glândula digestiva este aumento foi mais acentuado (134%), porém valores estatisticamente significativos somente foram observados após 48 h de exposição.

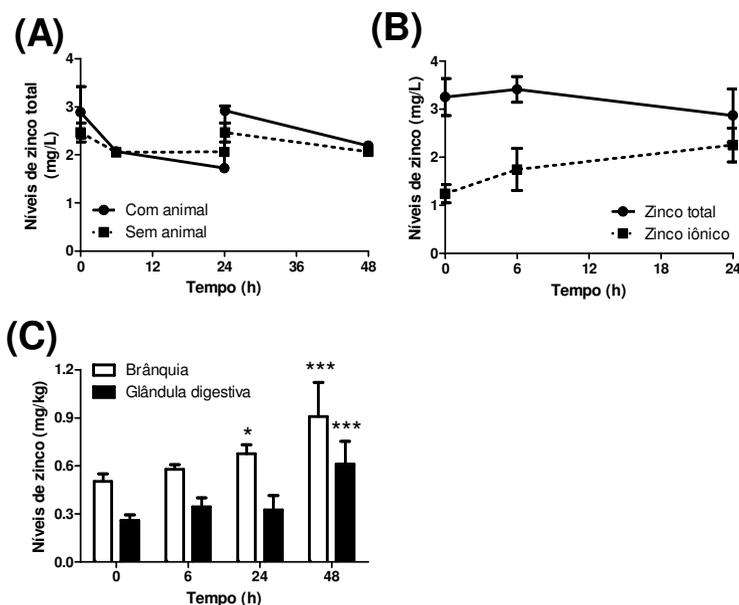


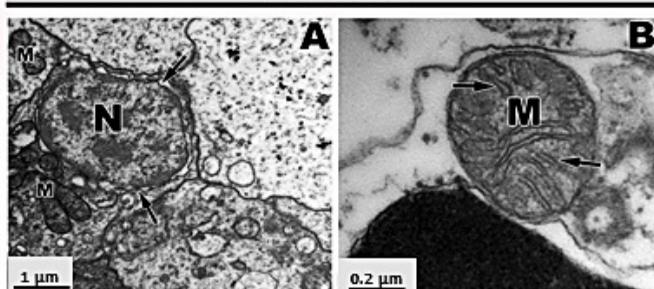
Figura 40: Análise dos níveis de zinco na água do mar, brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*. (A) Animais foram expostos a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) 4 mg/L por até 48 h e alíquotas de água do mar foram analisadas para níveis de zinco total. A quantificação também foi realizada na água do mar na ausência de animais. (B) Soluções de ZnONP 4mg/L em água do mar foram analisadas para os níveis de zinco iônico dissociado das ZnONP após remoção das nanopartículas por ultrafiltração, ou para os níveis de zinco total, na ausência de animais. (C) Níveis de zinco em tecidos de ostras expostas a ZnONP 4 mg/L por até 48 h. Diferenças estatísticas com relação ao grupo controle são indicadas como * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$), de acordo com ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Duncan. Dados são representados como média \pm desvio padrão ($n = 3 - 6$).

As análises de MET em células ciliadas e com microvilos de filamentos de brânquias de animais controle (Fig. 41A e B) apontam para uma morfologia celular típica. Logo após 6 h de exposição (Fig. 41C e D) foi detectada perda de crista mitocondrial e a presença de vesículas endocíticas próximas à membrana celular, as quais não foram detectadas no grupo controle. Dentro destas vesículas foi observada a presença de partículas elétron-densas, indicando uma possível absorção de ZnONP por endocitose, porém o que ainda precisa ser confirmado.

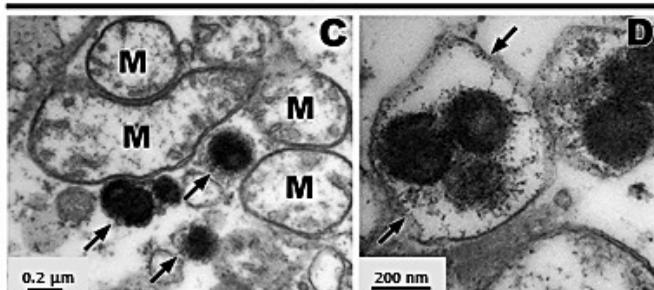
Danos a estruturas celulares aumentaram após 24 h de exposição (Fig. 41E e F), como inchamento da mitocôndria e alterações mais acentuadas nas cristas mitocondriais. Após 48 h (Fig. 41G - I) o citoplasma apresentou inúmeras partículas vesiculadas e alterações na estrutura das mitocôndrias.

Resultados similares foram detectados em glândulas digestivas analisadas por MET. No caso das células digestivas, a morfologia celular das células do grupo controle foi confirmada como típica, apresentando núcleo com cromatina marginal, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias intactas (Fig. 42A e B). Após 6 h de exposição a ZnONP foi detectada grande quantidade de vesículas, porém sem outras alterações morfológicas (Fig. 42C - E). Após 24 h (Fig. 42F - H) e 48 h (Fig. 42I e J), assim como nas brânquias, foram observados distúrbios na crista mitocondrial e citoplasma com grande número de vesículas contendo partículas elétron-densas.

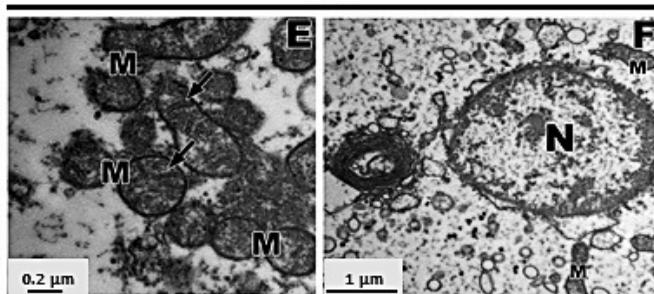
Controle



6 h



24 h



48 h

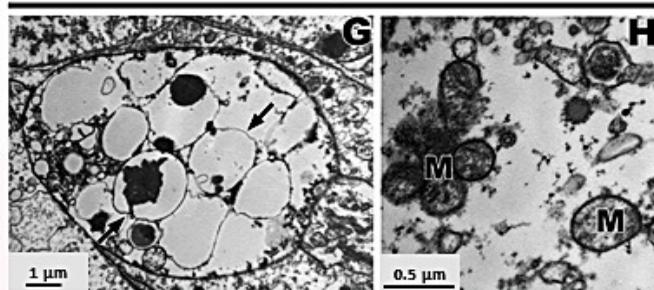
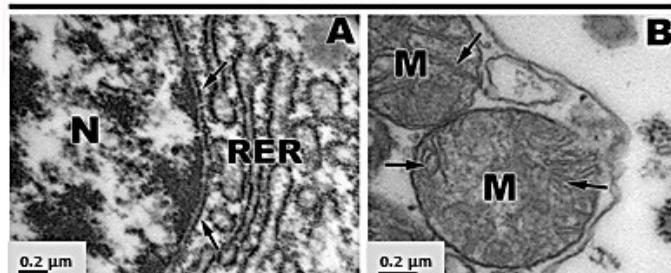
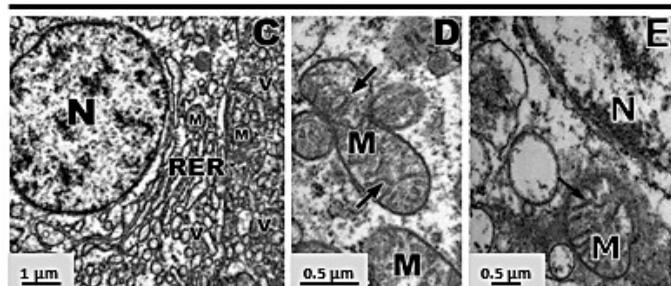


Figura 41: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células ciliadas e com microvilos de filamentos branquiais de ostras *Crassostrea gigas* expostas à 4 mg/L nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h. (A e B) Células de animais controle demonstrando morfologia típica da mitocôndria (M) e do núcleo (N), incluindo detalhes da crista mitocondrial (setas). (C e D) Células após 6 h de exposição, ausência de crista mitocondrial e presença de vesículas endocíticas contendo partículas elétron-densas (setas). (E e F) Mitocôndria inchada e núcleo intacto. (G e H) Células após 48 h de exposição contendo citoplasma altamente vesiculado e mitocôndrias com distúrbios na estrutura de membranas.

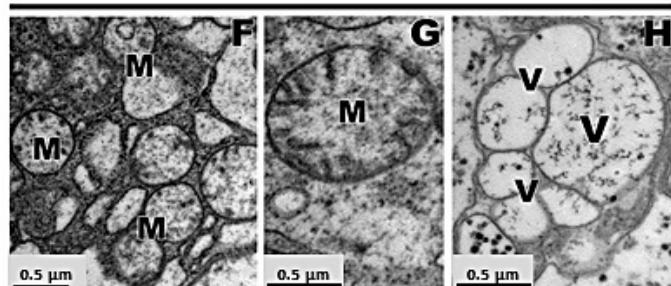
Controle



6 h



24 h



48 h

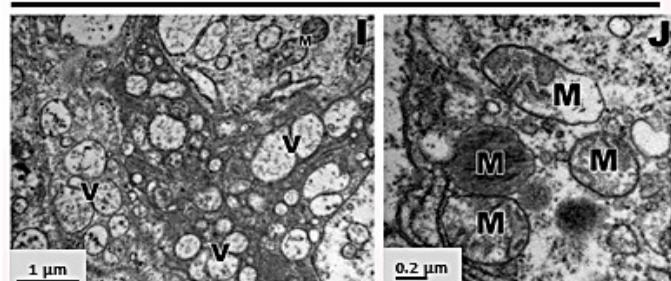


Figura 42: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células digestivas da glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h. (A e B) Células de animais controle demonstrando morfologia típica do núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER) com ribossomos aderidos (setas) e mitocôndria (M), incluindo detalhes da crista mitocondrial (setas). (C - E) Células após 6 h de exposição, com morfologia normal incluindo a presença de grânulos lipídicos (setas) e vesículas (V). (F - H) Células digestivas após 24 h de exposição, apresentando distúrbios na mitocôndria e grande quantidade de vesículas endocíticas com partículas elétron-densas. (I e J) Células digestivas após 48 h de exposição apresentando grande quantidade de vesículas no citoplasma com partículas elétron-densas e alterações na estrutura da mitocôndria de membranas.

4.3.4. Análises bioquímicas de ostras *C. gigas* expostas a ZnONP

A fim de melhor caracterizar os efeitos subletais de ZnONP em *C. gigas*, ostras foram expostas a ZnONP 4 mg/L por 24 e 48 h e análises bioquímicas e celulares foram realizadas em brânquia, glândula digestiva e hemócitos. Os níveis de tióis intracelulares foram determinados em brânquia e glândula digestiva. Na brânquia, nenhuma alteração foi detectada, exceto pela diminuição de 21% nos níveis de PSH após 48 h (Fig. 43D). É importante ressaltar que os animais controle no tempo de 48 h apresentaram níveis de PSH acima do grupo controle 24 h (Fig. 43D). Na glândula digestiva não foi detectada nenhuma alteração significativa em ambos os tempos de exposição.

Uma diminuição na atividade da GR (Fig. 44A) foi detectada na brânquia após 24 (- 29%) e 48 h (- 28%), assim como na glândula digestiva após 48 h (- 47%). Por outro lado, a atividade da enzima GPx aumentou na brânquia em 27% após 48 h, porém não foram detectadas alterações na glândula digestiva (Fig. 44B). Índícios de danos oxidativos foram detectados pelo ensaio de produtos finais da peroxidação lipídica (TBARS), com um aumento de 49% nas brânquias após 48 h de exposição à ZnONP (Fig. 44C). É importante ressaltar que os animais controle no tempo de 48 h apresentaram níveis de TBARS abaixo do grupo controle 24 h (Fig. 44C). As demais enzimas analisadas (Cat, TrxR, G6PDH e GAPDH) não sofreram alterações significativas em ambos os tecidos e tempos estudados (dados não apresentados).

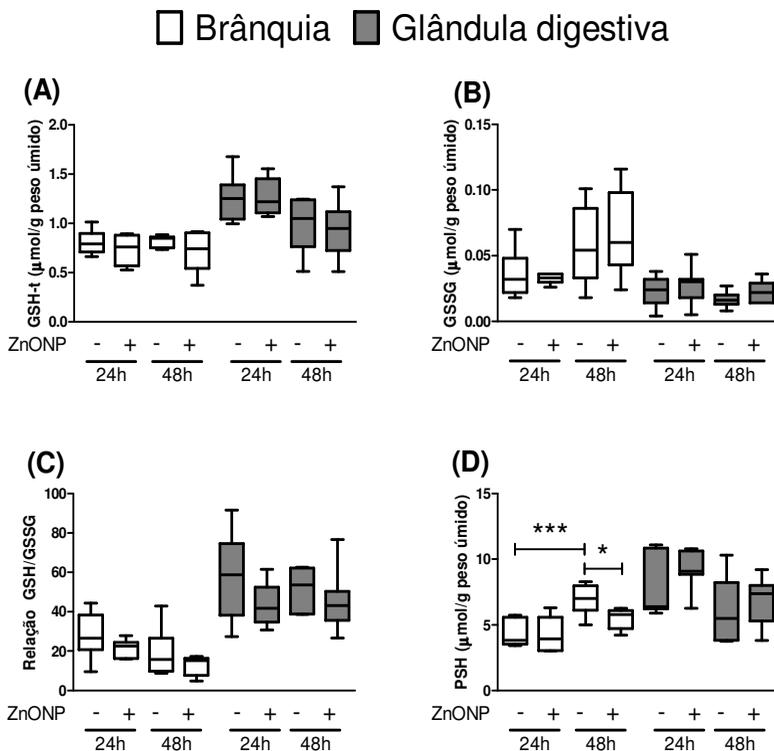


Figura 43: Análise do estado tiólico de brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* após exposição a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por até 48 h. (A) Níveis de glutatona total (GSH-t), (B) níveis do dissulfeto de glutatona (GSSG), (C) relação GSH/GSSG, (D) níveis de tióis proteicos (PSH). Os dados são apresentados na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos ($n = 7$). As diferenças estatísticas, obtidas através do teste t de Student entre os grupos tratados e seus respectivos controles, ou entre os grupos controle, estão indicadas como * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$).

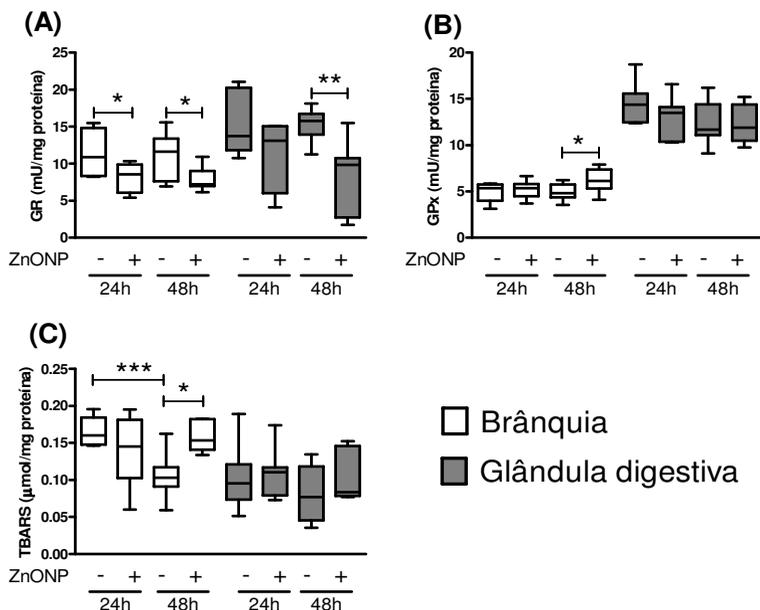


Figura 44: Análise da atividade de enzimas antioxidantes e dos níveis de peroxidação lipídica de brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* após exposição a 4 mg/L de nanopartículas de oxido de zinco (ZnONP) por até 48 h. (A) Glutaciona redutase (GR), (B) glutaciona peroxidase (GPx) e (C) níveis de peroxidação lipídica pelo ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados são apresentados na forma de boxplot, contendo a mediana, o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), com os desvios representando os valores mínimos e máximos ($n = 6 - 7$). As diferenças estatísticas, obtidas através do teste t de Student entre os grupos tratados e seus respectivos controles, ou entre os grupos controle, estão indicadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

4.3.5. Efeitos de ZnONP em hemócitos de *C. gigas*

Os efeitos das ZnONP em hemócitos de *C. gigas* foi investigado através de ensaios de viabilidade celular e de imunocompetência apenas após 48 h de exposição. Não foram detectadas alterações significativas na viabilidade celular estimada pelo método da redução do MTT e do vermelho neutro, ou no taxa de produção de ERO, fagocitose e de adesão celular (dados não apresentados).

4.3.6. Efeitos de ZnONP no perfil geral de oxidação de proteínas citosólicas e mitocondriais em *C. gigas*

As análises do perfil de oxidação de proteínas (seções 4.3.6 e 4.3.7) foram realizadas na República da Irlanda, no *Redox Proteomics Laboratory (University College Cork)*, coordenado pelo Prof. Dr. David Sheehan. Estas atividades foram desenvolvidas pelo aluno na forma de doutorado sanduíche entre os meses de março e dezembro de 2013.

Inicialmente foram quantificados os níveis totais de -SH livres e grupos carbonilas presentes por eletroforese unidimensional (1DE SDS-PAGE) utilizando IAF e FTSC como fluoróforos marcadores específicos para essas modificações pós-traducionais. Através deste método é possível caracterizar de maneira rápida os níveis de danos oxidativos em proteínas de diferentes organismos. Ambos os métodos foram aplicados com sucesso para *C. gigas*. Os sinais de fluorescência de proteínas marcadas com os fluoróforos específicos foram normalizados pelo sinal de proteínas totais coradas com Coomassie azul coloidal. As análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas para as análises de tióis livres e carbonilação nos extratos proteicos citosólicos de brânquias e glândulas digestivas de ostras expostas à ZnONP por 24 ou 48 h (dados não apresentados).

A fim de investigar se proteínas mitocondriais podem ser alvo da toxicidade de ZnONP, o isolamento de mitocôndrias de brânquias e de glândula digestiva de *C. gigas* foi realizado utilizando um protocolo de centrifugação diferencial. A validação do método foi realizada através da análise da atividade de proteínas citosólicas (G6PDH e GAPDH) e mitocondriais (Complexo IV) como marcadores de frações celulares em animais controle. Os resultados (dados não apresentados) confirmaram o isolamento mitocondrial: na brânquia, a atividade das enzimas citosólicas G6PDH e GAPDH foram maiores na fração pós-mitocondrial (5 e 15,5 vezes, respectivamente), assim como na glândula digestiva (2,7 e 14,8 vezes, respectivamente). O complexo mitocondrial IV apresentou maior atividade enzimática na fração mitocondrial tanto em brânquias (4,0 vezes) como na glândula digestiva (3,3 vezes).

Géis 1DE SDS-PAGE representativos para a visualização de proteínas mitocondriais totais coradas com Coomassie azul coloidal e para proteínas mitocondriais marcadas com IAF ou FTSC podem ser visualizados nas figuras 45 e 46. A quantificação destes dados em brânquias demonstra uma diminuição de 32 % no sinal de IAF após 24 h de exposição a ZnONP (Fig. 47A), indicando menores níveis de SH livres presentes em proteínas. Na glândula digestiva foi detectado apenas uma tendência de diminuição ($p = 0,053$, Fig. 47B). Após 48 h

de exposição ocorreu uma diminuição do sinal de IAF tanto na brânquia (30 %, Fig. 47A) como na glândula digestiva (59%, Fig. 47B). Para os grupos carbonilas de proteínas, tanto para a brânquia como para a glândula digestiva, as diferenças não foram estatisticamente significativas após 24 ou 48 h de exposição à 4 mg/L de ZnONP (dados não apresentados).

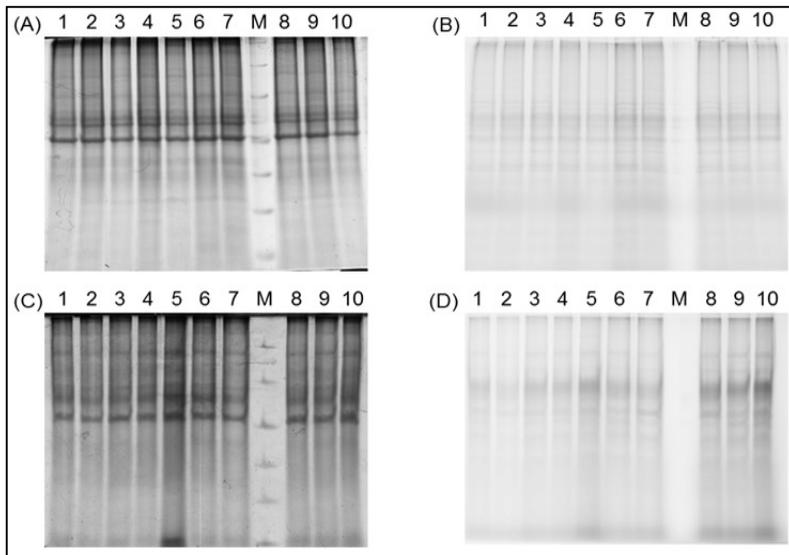


Figura 45: Imagens representativas de géis de 1DE SDS-PAGE de extratos proteicos mitocondriais de brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e analisados para a detecção do conteúdo de tíois proteicos livres. Visualização do nível total de proteínas por coloração de Coomassie coloidal de brânquias (A) e glândula digestiva (C). Imagens de fluorescência de tíois proteicos livres marcados com 5-iodoacetamida-fluoresceína (IAF) em brânquias (B) e glândula digestiva (D). Géis contem marcadores de peso molecular (M) e 25 µg de proteínas de grupo controle (1-5) ou do grupo ZnONP 48 h (6-10).

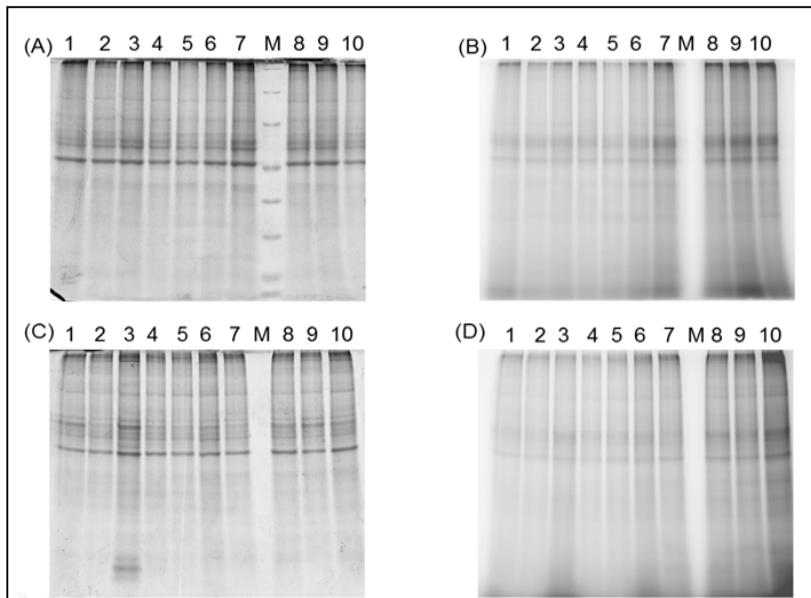


Figura 46: Imagens representativas de géis de 1DE SDS-PAGE de extratos proteicos mitocondriais de brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e analisados para a detecção do conteúdo de grupos carbonilas em proteínas. Visualização do nível total de proteínas por coloração de Coomassie coloidal de brânquias (A) e glândula digestiva (C). Imagens de fluorescência de grupos carbonilas em proteínas marcados com 5-tiosemicarbazida-fluoresceína (FTSC) em brânquias (B) e glândula digestiva (D). Géis contêm marcadores de peso molecular (M) e 12,5 µg de proteínas em cada amostra do grupo controle (1-5) ou do grupo ZnONP 48 h (6-10).

Para melhor caracterizar os efeitos oxidativos das ZnONP na fração mitocondrial e em ostras *C. gigas*, duas enzimas mitocondriais relacionadas ao transporte de elétrons (complexo I e IV) foram analisadas na brânquia e glândula digestiva após 24 e 48 h de exposição. A atividade do complexo IV não sofreu alterações significativas na brânquia (Fig. 48A), porém diminuiu 25% na glândula digestiva após 48 h (Fig. 48B).

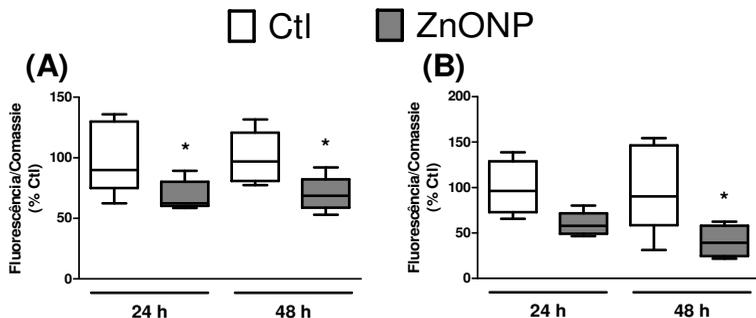


Figura 47: Análise dos níveis de tióis proteicos livres em proteínas mitocondriais por 1DE SDS-PAGE em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 24 ou 48 h. Níveis de tióis proteicos livres na (A) brânquia e (B) glândula digestiva. Os dados são representados como boxplot contendo media, primeiro (25%) e terceiro quartil (75%), e os desvios representam os valores mínimos e máximos (n = 5). Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias seguidos do teste *post hoc* de Duncan e estão indicadas como * ($p < 0,05$).

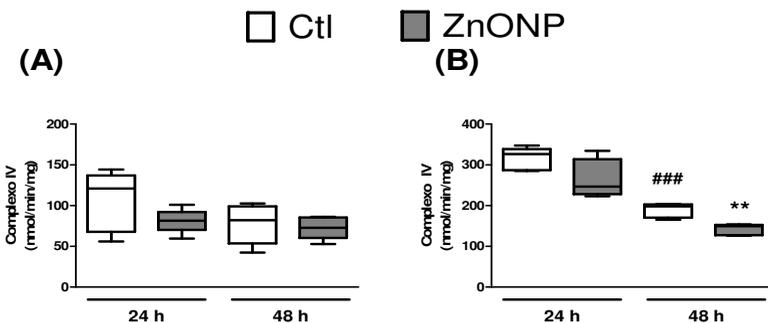


Figura 48: Atividade da enzima mitocondrial citocromo c oxidase (complexo IV) em brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4 mg/L de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 24 ou 48 h. (A) brânquia; (B) glândula digestiva. Os dados são representados como boxplot contendo media, primeiro (25%) e terceiro quartil (75%), e os desvios representam os valores mínimos e máximos (n = 5). Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias seguidos do teste *post hoc* de Duncan e estão indicadas como ** ($p < 0,01$). Diferenças entre os grupos controles para cada tempo são representadas como ### ($p < 0,001$).

4.3.7. Identificação de proteínas de *C. gigas* sensíveis à exposição de ZnONP

Apesar de não terem sido detectados sinais evidentes de moderado a elevado estresse oxidativo no citosol (baseado nos dados de 1DE SDS-PAGE e ensaios enzimáticos), observamos que as enzimas GR e GPx, assim como os níveis de PSH e de TBARS foram afetados por ZnONP em brânquias de *C. gigas* (Fig. 43 e 44). Estes dados são indicativos de processos oxidantes no citosol. Neste contexto é possível que proteínas específicas estejam sofrendo processos oxidativos, porém sem afetar intensamente o perfil geral de oxidação de proteínas (analisado pela técnica de 1DE SDS-PAGE). Desta forma, buscamos investigar se existem proteínas sensíveis a processos oxidativos em extratos proteicos citosólicos, analisado por eletroforese em duas dimensões (2DE SDS-PAGE) em brânquias de *C. gigas* expostas a ZnONP por 48h (Fig. 49).

Ao todo 458 “spots” foram detectados em extratos de proteínas com tióis marcados com IAF para a visualização de proteínas contendo tióis livres, dos quais 441 permaneceram inalterados com a exposição a ZnONP enquanto que 17 tiveram ao menos 50% de diferença no sinal em relação ao grupo controle (Fig. 50). A lista de “spots” com sinal de fluorescência alterado pode ser visualizada na Tabela 4.

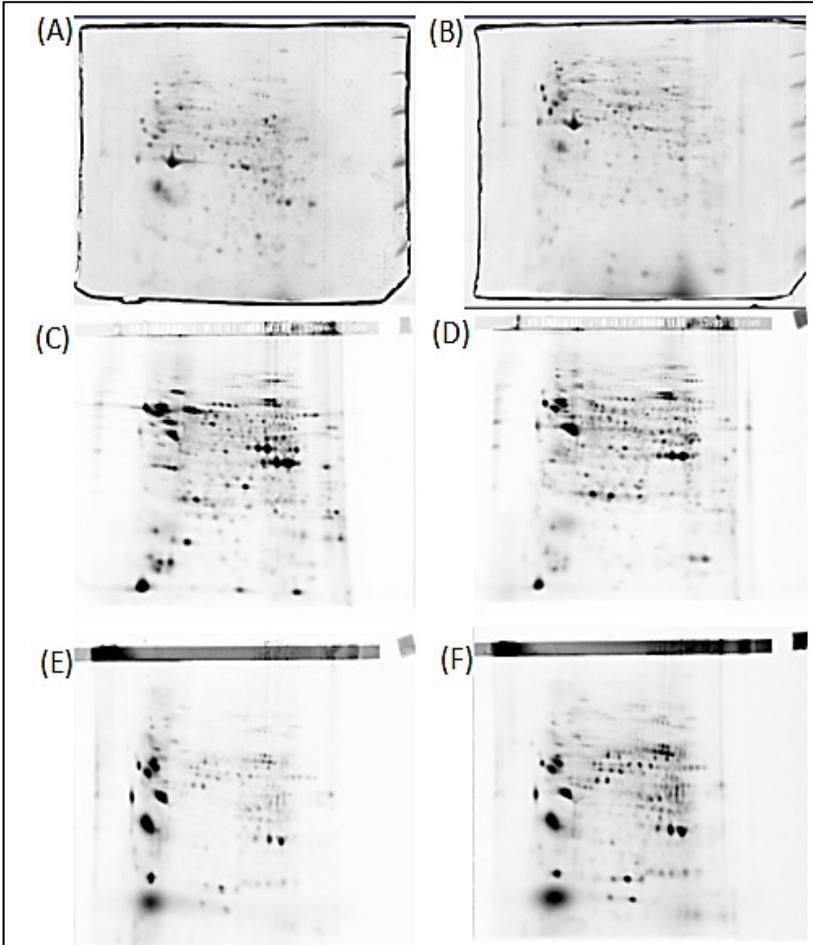


Figura 49: Imagens representativas de géis 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos de brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h. Visualização das proteínas totais por coloração de Coomassie coloidal (A e B); imagens de fluorescência de tióis proteicos livres marcados com 5-iodoacetamida fluoresceína (C e D); imagens de fluorescência de grupos carbonilas em proteínas marcados com 5-tiosemicarbazida fluoresceína (E e F). Os géis de 2DE SDS-PAGE foram realizados após eletrofocalização com tiras de 7 cm (ph 3-10, não linear) empregando géis com 12% de poliacrilamida.

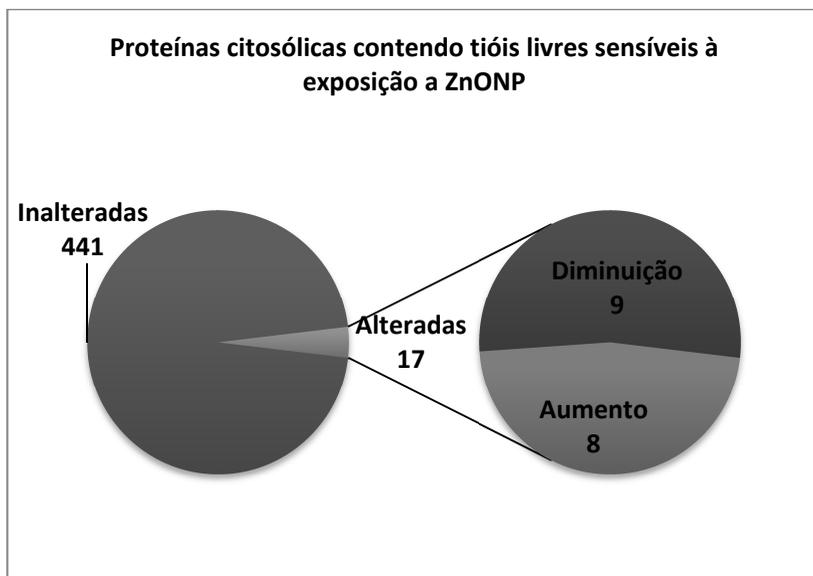


Figura 50: Representação gráfica do número de proteínas com grupos tiólicos livres detectados em extratos proteicos citosólicos analisados por 2DE SDS-PAGE de brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h. As proteínas foram marcadas com 5-iodoacetamida-fluoresceína (IAF). Os géis foram analisados pelo software SameSpots, e o volume de cada “spot” foi comparado entre o grupo controle e exposto por ANOVA de uma via. “Spots” com pelo menos 1,5 X de diferença no volume entre os grupos e $p < 0,05$ foram selecionados como proteínas de interesse.

Tabela 4: Lista de “spots” detectados por 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos marcados com 5-iodoacetamida fluoresceína (IAF), os quais apresentaram variações nos grupos tiólicos livres em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 48h, em relação ao grupo controle.

Número do “spot”	Anova (p)	Diferença em relação ao controle (vezes)	Efeito da exposição a ZnONP em relação ao grupo controle
369	0.001186	2	Diminuição
243	0.000514	1,8	Diminuição
199	1.55E-06	1,7	Diminuição
213	0.000358	1,7	Diminuição
397	0.022858	1,6	Diminuição

Tabela 4: continuação

384	0.002188	1,5	Diminuição
219	0.009769	1,5	Diminuição
382	0.010819	1,5	Diminuição
450	0.012923	1,5	Diminuição
427	0.000779	2	Aumento
480	0.037185	1,8	Aumento
379	0.00299	1,6	Aumento
429	0.000604	1,5	Aumento
495	0.002547	1,5	Aumento
496	0.006237	1,5	Aumento
277	0.011944	1,5	Aumento
313	0.020014	1,5	Aumento

Além disso, 313 “spots” de proteínas carboniladas foram detectados após a marcação com FTSC em extratos de proteínas nas brânquias, dos quais 277 permaneceram inalterados e 36 tiveram ao menos 50% de diferença no sinal de fluorescência entre os grupos analisados. Destes, 21 “spots” apresentaram um aumento no sinal enquanto que 15 tiveram uma diminuição (Fig. 51). A lista de “spots” com sinal de fluorescência alterado pode ser visualizada na Tabela 5.

Também foram analisadas as proteínas totais das brânquias com diferentes perfis de expressão entre o grupo controle e o grupo exposto a ZnONP por 48 h. Nesta técnica, não são empregados marcadores fluorescentes, mas sim utilizando apenas a coloração de Coomassie coloidal. Foi detectado um total de 726 “spots”, dos quais 672 permaneceram inalterados e 55 tiveram ao menos 50% de diferença no sinal da coloração entre os grupos analisados. Destes, 24 “spots” apresentaram um aumento no sinal enquanto que 31 tiveram uma diminuição (Fig. 52). A lista destes 55 “spots” pode ser visualizada na Tabela 6.

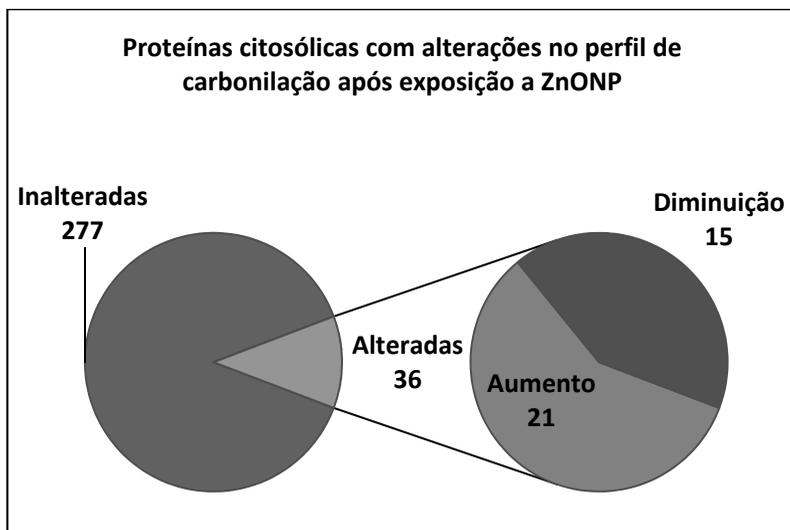


Figura 51: Representação gráfica do número de proteínas com grupos carbonílicos detectadas em extratos proteicos citosólicos analisados por 2DE SDS-PAGE de brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h. As proteínas foram marcadas com 5-tiosemicarbazida-fluoresceína (FTSC). Os géis foram analisados pelo software SameSpots, e o volume de cada “spot” foi comparado entre o grupo controle e exposto por ANOVA de uma via. “Spots” com pelo menos 1,5 X de diferença no volume entre os grupos e $p < 0,05$ foram selecionados como proteínas de interesse.

Tabela 5: Lista de “spots” detectados por 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos marcados com 5-tiosemicarbazida-fluoresceína (FTSC) para a detecção de proteínas contendo grupos carbonílicos em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 48h.

Número do spot	Anova (p)	Diferença em relação ao grupo controle (vezes)	Efeito da exposição a ZnONP em relação ao grupo controle
313	0.00626	2,3	Diminuição
124	1.38E-06	2,1	Diminuição
125	0.000274	2	Diminuição
310	0.009715	2	Diminuição
265	0.004006	1,7	Diminuição

Tabela 5: continuação

304	8.29E-06	1,6	Diminuição
150	2.22E-05	1,6	Diminuição
274	0.000706	1,6	Diminuição
250	0.001012	1,6	Diminuição
205	0.022031	1,6	Diminuição
155	0.000665	1,5	Diminuição
299	0.000851	1,5	Diminuição
254	0.001686	1,5	Diminuição
154	0.01564	1,5	Diminuição
1	0.016594	1,5	Diminuição
283	9.25E-05	2,1	Aumento
58	6.47E-05	1,8	Aumento
127	0.000473	1,7	Aumento
306	0.002979	1,7	Aumento
143	0.005195	1,7	Aumento
223	9.17E-05	1,6	Aumento
230	0.001589	1,6	Aumento
325	0.005607	1,6	Aumento
158	0.009637	1,6	Aumento
331	0.015437	1,6	Aumento
280	0.018674	1,6	Aumento
303	0.000516	1,5	Aumento
100	0.002527	1,5	Aumento
187	0.004357	1,5	Aumento
86	0.006256	1,5	Aumento
29	0.008912	1,5	Aumento
312	0.011887	1,5	Aumento
298	0.012758	1,5	Aumento
12	0.020183	1,5	Aumento
22	0.02299	1,5	Aumento
330	0.040022	1,5	Aumento

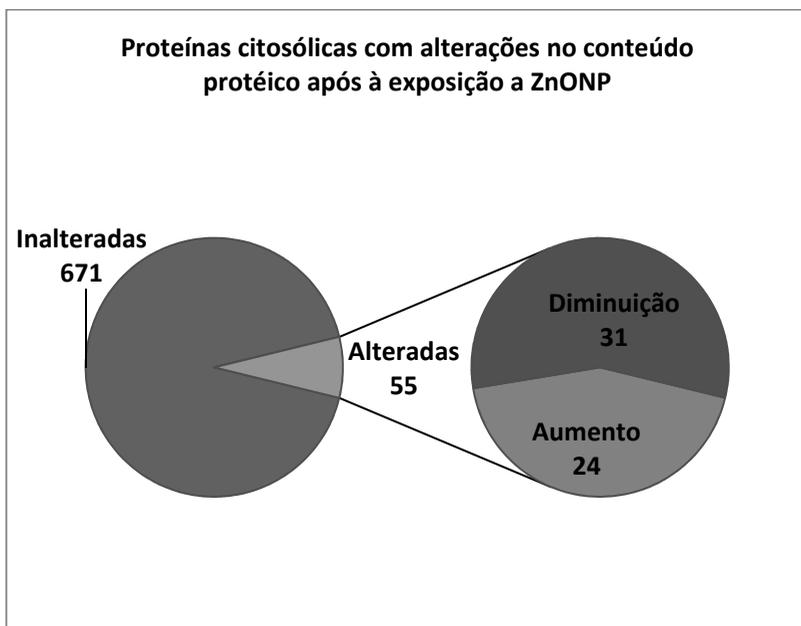


Figura 52: Representação gráfica do número de proteínas com diferentes perfis de expressão detectados em extratos proteicos citosólicos analisados por 2DE SDS-PAGE de brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a 4mg/L de nanopartículas de óxido de zinco por 48 h. As proteínas foram coradas com Coomassie coloidal e os géis foram analisados pelo software SameSpots. O volume de cada “spot” foi comparado entre o grupo controle e exposto por ANOVA de uma via e os “spots” com pelo menos 1,5 X de diferença no volume entre os grupos e $p < 0,05$ foram seleccionados como proteínas de interesse.

Tabela 6: Lista de “spots” detectados por 2DE SDS-PAGE de extratos proteicos citosólicos corados com Coomassie coloidal para detecção de diferentes níveis de expressão proteica em brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) por 48h.

Número	Anova (p)	Diferença em relação ao grupo controle	Efeito da exposição a ZnONP em relação ao grupo controle
340	1.36E-06	1,5	Aumento
575	2.21E-06	2,5	Aumento
1378	1.29E-05	1,8	Aumento

Tabela 6: continuação

374	1.67E-05	1,7	Aumento
209	2.08E-05	1,8	Aumento
531	2.24E-05	1,6	Aumento
418	3.92E-05	1,6	Aumento
147	0.047927	1,5	Aumento
1377	0.00016	1,8	Aumento
632	0.010066	1,5	Aumento
377	0.000295	1,6	Aumento
598	0.018762	1,5	Aumento
18	0.000374	1,7	Aumento
208	0.006667	1,5	Aumento
328	0.019641	1,5	Aumento
717	0.003735	1,7	Aumento
109	0.010878	1,5	Aumento
728	0.001706	1,8	Aumento
460	0.018163	1,5	Aumento
625	0.040225	1,5	Aumento
543	0.002481	1,5	Aumento
894	0.011973	1,6	Aumento
581	0.015313	1,7	Aumento
369	0.009424	1,6	Aumento
977	0.002902	2,5	Diminuição
1234	0.004738	1,6	Diminuição
653	0.001945	2,1	Diminuição
316	0.001954	1,7	Diminuição
1193	0.000407	1,5	Diminuição
294	0.003331	1,5	Diminuição
805	0.000615	1,6	Diminuição
794	0.000276	2	Diminuição
943	0.001474	1,6	Diminuição
547	0.010871	1,6	Diminuição
734	0.003802	1,6	Diminuição
984	0.011841	2,4	Diminuição
503	0.004801	2,1	Diminuição
669	0.014186	2,7	Diminuição
848	0.014674	1,5	Diminuição
1028	0.014891	1,7	Diminuição
867	0.00034	1,7	Diminuição
454	0.016311	1,6	Diminuição
530	0.000553	1,5	Diminuição
596	0.018185	2	Diminuição
1059	0.01854	2,7	Diminuição
291	6.89E-05	2,2	Diminuição
654	0.007184	1,5	Diminuição

Tabela 6: continuação			
662	0.02043	1,5	Diminuição
1040	0.032728	2,6	Diminuição
1033	0.037588	1,5	Diminuição
1011	0.010353	1,6	Diminuição
1309	0.043231	1,5	Diminuição
646	0.044241	1,7	Diminuição
238	0.046696	1,5	Diminuição
968	0.006345	1,7	Diminuição

Após as análises estatísticas, as proteínas de interesse que possuíam bom perfil de separação e conteúdo proteico foram selecionadas do gel para posterior identificação por espectrometria de massa (total de 40 “spots”).

Além disso, proteínas mitocondriais contendo cisteínas reduzidas foram purificadas utilizando sefarose contendo tiol ativado (seção 3.4.8), a fim de caracterizar proteínas sensíveis à estresse oxidativo nesta organela. Este protocolo utiliza uma sefarose acoplada a uma molécula de glutationa, a qual forma um dissulfeto com uma molécula de 2-piridil. Esta ponte dissulfeto pode ser quebrada na presença de proteínas contendo grupos –SH livres (reduzidos), gerando um dissulfeto misto entre a sefarose e a proteína, e liberando 2-tiopiridona. Dessa forma, é possível separar por centrifugação as proteínas contendo –SH livres, para posterior análise por espectrometria de massa.

Até o presente momento, não foi possível realizar a identificação dos “spots” selecionados dos géis de 2DE SDS-PAGE, assim como das proteínas separadas por sefarose ativada. A partir das análises de espectrometria de massa, será possível identificar proteínas que apresentaram diferente perfil de oxidação e de expressão proteica na brânquia de *C. gigas* após exposição aguda a ZnONP.

5. DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO 1

A fim de caracterizar o papel da brânquia, glândula digestiva e hemolinfa no processo de biotransformação do CDNB, ostras *C. gigas* foram expostas a CDNB 10 μM por até 24 h. Tecidos e alíquotas de água do mar foram coletados em diferentes tempos para análises químicas, moleculares e bioquímicas. Os efeitos do CDNB sobre o sistema antioxidante também foram investigados, assim como o possível papel protetor da brânquia contra agentes eletrofílicos. Estes dados estão sumarizados na figura 53, e serão discutidos a seguir.

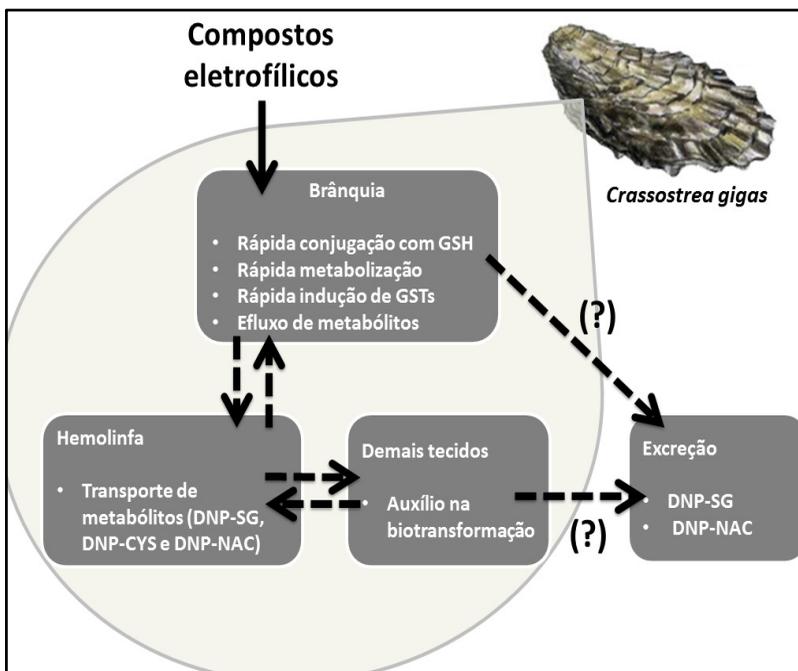


Figura 53: Hipótese levantada sobre o papel da brânquia na proteção contra agentes eletrofílicos em ostras *Crassostrea gigas*. Compostos eletrofílicos presentes na água do mar são absorvidos pela brânquia, sendo rapidamente conjugados com glutatona (GSH) através da enzima glutatona S-transferase (GST). A brânquia também apresenta uma alta e rápida capacidade de indução de dois genes que codificam para isoformas de GST, levando ao aumento na atividade dessa enzima em 24 h. Os dados indicam que os compostos gerados neste processo são, então, exportados para fora da célula, atingindo a hemolinfa. Neste processo, os conjugados podem sofrer ação de

peptidases presentes no lado externo da membrana celular das células irrigadas com hemolinfa, gerando compostos conjugados da via do ácido mercaptúrico. O CDNB, conjugado de glutathiona e metabólitos da via do ácido mercaptúrico também podem ser transportados para os demais tecidos do organismo através da hemolinfa. Por exemplo, os resultados mostram quantidades mensuráveis de DNP-SG, DNP-CYS e DNP-NAC na glândula digestiva, indicando que este órgão pode auxiliar no processo de biotransformação. A presença de DNP-SG e DNP-NAC na água do mar indica que excreção para o meio externo é uma provável rota de eliminação de xenobióticos em bivalves. Qual tecido desempenha o papel de excreção desses compostos ainda não pode ser identificado. Dessa forma, a brânquia atua como uma primeira barreira, metabolizando rapidamente compostos eletrofílicos através da ação da GSH e GST, prevenindo que estes compostos eletrofílicos (CDNB neste trabalho) atinjam outros tecidos, e conseqüentemente, diminuindo a toxicidade para estes demais tecidos e, eventualmente, oferecer proteção ao organismo como um todo.

5.1.1. Absorção, metabolização e excreção de CDNB

Inicialmente foi investigado o desaparecimento de CDNB da água do mar ao longo da exposição. O curto tempo de meia vida (aproximadamente 1h, Fig. 19) sugere uma rápida absorção deste composto pelo organismo, o que é facilitado devido a suas características hidrofóbicas. Não foi possível quantificar o CDNB nos tecidos através de HPLC e detecção UV devido à interferência de moléculas orgânicas na faixa de 280 nm, onde se encontra o pico de absorção do CDNB.

No caso de bivalves, os dados do presente trabalho podem ser considerados pioneiros nesta área de biotransformação de fase II e do ácido mercaptúrico. Os resultados obtidos pela análise dos níveis dos conjugados de glutathiona (DNP-SG, Fig. 20), de cisteína (DNP-CYS, Fig. 21) e de N-acetilcisteína (DNP-NAC, Fig. 22) obtidos a partir da metabolização do CDNB apontam para um papel diferencial para cada um dos tecidos estudados (brânquia, glândula digestiva e hemolinfa, vide Fig. 53). Em paralelo ao rápido desaparecimento do CDNB na água do mar, foi detectado um rápido aparecimento de DNP-SG e DNP-CYS na brânquia, apresentando um pico máximo após 60 min de exposição. O DNP-SG é o composto derivado da conjugação entre CDNB e GSH, mediado pela enzima GST (BOYLAND; CHASSEAUD, 1969). O consumo de GSH-t ao longo do tempo de exposição na brânquia (Fig. 23) complementa a ideia de absorção de CDNB seguido de sua conjugação com GSH, gerando DNP-SG nos tecidos. Os dados indicam que em *C. gigas*, este processo está ocorrendo preferencialmente na

brânquia, uma vez que foram detectados níveis bem mais baixos de DNP-SG na glândula digestiva e hemolinfa, além de não terem sido observados os efeitos do CDNB em parâmetros do sistema de biotransformação e antioxidante na glândula digestiva (consumo de GSH-t, aumento na expressão e atividade de GST, inibição da GR e TrxR). Este papel protetor da brânquia pode ser facilitado pelo fato de seu contato direto com o meio externo, ao contrário da hemolinfa e da glândula digestiva, que possuem pouca superfície diretamente exposta ao meio externo.

O DNP-SG foi rapidamente metabolizado em *C. gigas*, uma vez que foi observado seu desaparecimento dos tecidos ao longo do tempo (a partir de 1 - 4 h), com um aparecimento de baixas concentrações na água do mar após 4-10 horas de exposição. Neste caso, não é possível indicar um comportamento preferencial de excreção de DNP-SG na água do mar em detrimento de sua metabolização, uma vez que sua concentração detectada na água do mar foi relativamente baixa (0,06 – 0,18 μM).

Este papel de conjugação de compostos eletrofílicos com GSH via GST, seguido de seu transporte para posterior metabolização ou excreção, já é bem caracterizado em diversos modelos de estudo. Um trabalho interessante relacionado ao metabolismo de CDNB foi realizado com cultura primária de células da placenta (S. VAIDYA; W. WALSH; M. GERK, 2011). A placenta atua como uma importante barreira relacionada com trocas gasosas, excreção e absorção de nutrientes, características semelhantes ao papel da brânquia em bivalves. Os dados apontaram para o consumo de GSH e formação de DNP-SG, seguido de sua rápida excreção através de proteínas transportadoras do tipo ABC, provavelmente para posterior metabolização pela via do ácido mercaptúrico pelos órgãos maternos. Estudos com mamíferos já relataram resultados semelhantes de excreção de conjugados de DNP-SG por proteínas ABC em tecidos ou órgãos atuantes como barreiras protetoras como intestino (URŠIČ et al., 2009) e plexo coróide (GHERSI-EGEA et al., 2006), além de órgãos com alta capacidade de metabolização como o fígado (VILLANUEVA et al., 2005) e rins (TERLOUW et al., 2001). Células cancerígenas também apresentam uma forte atividade de conjugação do CDNB com GSH, seguido da excreção de DNP-SG. Esta atividade aumenta a resistência destas células contra fármacos com características eletrofílicas (ZHANG; WONG, 1996). Outros organismos já apresentaram esse padrão, reforçando a ideia de um mecanismo de defesa celular preservado evolutivamente. Por exemplo, em plantas este padrão de exporte de

conjugados de GSH pode ser detectado, onde os conjugados de GSH são transportados em direção à ponta das raízes para sua excreção naquele tecido (SCHRÖDER et al., 2007). Em bactérias esse mecanismo também foi detectado, estando relacionado com a proteção contra compostos eletrofílicos exógenos (ZABLOTOWICZ et al., 1995). Desta forma, a rápida conjugação de CDNB com GSH, gerando DNP-SG principalmente na brânquia de ostras *C. gigas* expostas a CDNB, está de acordo com estudos de diferentes organismos-modelo, reforçando a ideia de uma barreira metabólica efetiva neste órgão.

Apesar de ainda não ter sido descrita em bivalves ou mesmo peixes, os altos níveis de DNP-CYS, o qual é obtido a partir do DNP-SG após a remoção dos resíduos de γ -glutamil e cisteína, geralmente mediado por peptidases extracelulares, comprovam que a via do ácido mercaptúrico é ativa em *C. gigas*. A brânquia foi importante nesta via de biotransformação, sendo um local preferencial de formação inicial de DNP-SG, também apresentando os mais altos níveis de DNP-CYS. A hemolinfa apresentou baixos níveis de DNP-SG (7,0 μ M) (Fig. 20A), porém com altas concentrações de DNP-CYS (117 μ M) (Fig. 21A). Este comportamento indica que, a partir da exportação de DNP-SG pela brânquia, o DNP-CYS é transportado para a hemolinfa ou então formado no ambiente extracelular irrigado pela própria hemolinfa. A prevalência de DNP-SG e DNP-CYS na brânquia, com concentração máxima em uma hora, em relação à glândula digestiva, com concentração máxima em 4 h, reforça essa ideia de que a brânquia exporta um dos precursores de DNP-CYS (DNP-SG, DNP-CG ou o próprio DNP-CYS). Devido ao sistema circulatório aberto dos bivalves, o DNP-SG ou outros precursores de DNP-CYS, podem ser rapidamente liberados para a hemolinfa e dali, então, transportados para outros tecidos (Fig. 53).

Os níveis de DNP-CYS nos tecidos também chegaram próximos de zero ao fim da exposição, porém sem apresentar um evidente aumento na água do mar, sugerindo a existência de uma etapa subsequente de sua metabolização. Os níveis de DNP-NAC (Fig. 22A), metabólito final da via do ácido mercaptúrico, podem explicar este processo: após o DNP-CYS ser transportado via hemolinfa para outros tecidos, ele pode ser captado e biotransformado em diferentes locais, levando ao aparecimento de sua forma N-acetilada (DNP-NAC). Quatro horas após o início da exposição, o DNP-NAC atingiu seu pico máximo em todos os tecidos analisados. Além disso, este composto apresentou concentração 3 vezes maior na hemolinfa, em comparação com a

brânquia e a glândula digestiva, sugerindo que uma vez formado, este composto rapidamente se acumula no meio extracelular (hemolinfa). Os dados sugerem que a hemolinfa atue recebendo e transportando este composto para posterior excreção. Apesar de não estar claro qual tecido atua neste papel de excreção, a brânquia tem uma enorme superfície em contato com o ambiente externo, o que facilitaria a excreção para a água do mar. O aumento gradativo e linear nos níveis de DNP-NAC na água do mar (Fig. 23B) reforça a ideia de que o DNP-NAC é o principal metabólito do CDNB excretado pela ostra.

Possivelmente, a excreção de DNP-NAC está relacionada com o aumento de Abs em 340 nm na água do mar (Fig. 19), o que ainda precisa ser confirmado. Entretanto, os principais picos (de maior área) detectados nos cromatogramas tanto nos tecidos como na água do mar foram o DNP-SG, DNP-CYS e DNP-NAC, com a presença de outros compostos com picos de pequena área em outros tempos de retenção (Fig. 18). Apesar de ser o principal metabólito encontrado na água do mar dentre os compostos estudados, não sabemos se outras vias metabólicas, como a glucoronidação e sulfatação estão presentes nos bivalves de maneira efetiva, tendo em vista que seus metabólitos não foram alvos das análises de HPLC. Se for este o caso, o aumento de Abs em 340 nm na água do mar pode ser devido a vários metabólitos do CDNB, o que precisa ser confirmado.

A exportação de conjugados de glutatona, e de seus metabólitos da via do ácido mercaptúrico, pode ser realizado através de proteínas de exporte do tipo ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), as quais estão presentes em bivalves e também estão relacionadas à processos de defesas celulares (LUCKENBACH; ALTENBURGER; EPEL, 2008; PAIN; PARANT, 2007; WHALEN et al., 2010). Aparentemente, as brânquias podem ser um importante local para a metabolização inicial e excreção de substâncias eletrofílicas, o que pode constituir-se em uma importante barreira de proteção para os demais tecidos do organismo.

Até o presente momento este é o primeiro estudo a respeito do metabolismo de conjugados de glutatona em bivalves. Entretanto, vários trabalhos reportam a forte influência da biotransformação de fase II na defesa dos organismos contra contaminantes ambientais (vide seção 1.4), enquanto que outros autores detectaram a presença de metabólitos de ficotoxinas conjugadas com glutatona e derivados da via do ácido mercaptúrico (ABRAHAM et al., 2012; CHEN; XIE, 2005; WANG et al., 2004). É interessante ressaltar que trabalhos com bivalves expostos a ficotoxinas purificadas ou a algas produtoras de ficotoxinas indicaram a ocorrência de síntese de GSH em paralelo a um aumento na

atividade da GST e de proteínas de exporte do tipo ABC em diferentes órgãos (BURMESTER; NIMPTSCH; WIEGAND, 2012; CHOI et al., 2006; CONTARDO-JARA; PFLUGMACHER; WIEGAND, 2008; FERNANDES; WELKER; VASCONCELOS, 2009; GARCÍA-LAGUNAS; ROMERO-GERALDO; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, 2013; SABATINI et al., 2011a; VASCONCELOS; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2007). Esta resposta celular sugere um papel central da via de biotransformação de fase II nestes organismos, incluindo a indução de genes de defesa celular.

De maneira semelhante ao processo ocorrido em *C. gigas*, a integração de diferentes órgãos no metabolismo do CDNB já foi exemplificada em mamíferos, através do papel do intestino, fígado, rins e sangue (HINCHMAN; BALLATORI, 1994). O fígado, com alta atividade GST, atua como ponto principal de conjugação de CDNB oriundo do sangue. A alta atividade de peptidases nos rins permite a rápida metabolização de DNP-SG a DNP-CYS, enquanto que a baixa atividade dessas enzimas no fígado dificulta a sua atuação nessa etapa catabólica. No caso da N-acetiltransferase, tanto o fígado como os rins apresentam alta atividade, e conseqüentemente ambos podem atuar na acetilação de conjugados de cisteína e gerar mercapturatos. O intestino também possui alta atividade GST e de peptidases, podendo gerar conjugados de cisteína para serem N-acetilados pelo fígado. A excreção do DNP-NAC ocorre preferencialmente pela urina, porém a bile também é outra opção de via de excreção. Desta forma, o metabolismo de conjugados de glutathione (via do ácido mercaptúrico) em mamíferos está conectado através de diferentes órgãos, com o sangue atuando como importante meio para transporte. No caso de bivalves, esta área de estudo ainda é totalmente desconhecida, mas os dados indicam um mecanismo semelhante, com diferentes órgãos atuando através do transporte mediado pela hemolinfa. O presente estudo pode fornecer pistas interessantes sobre a cinética desta via em ostras *C. gigas*, indicando que a brânquia e a hemolinfa possuem um papel importante na via do ácido mercaptúrico.

5.1.2. Modulação do sistema antioxidante e de biotransformação por CDNB

Em conjunto com o consumo de GSH-t causado por CDNB, também foi detectada a inibição das enzimas GR e TrxR em brânquias, entre 4 e 24 h de exposição, e o aumento na atividade da GST (Fig. 23). Na glândula digestiva não foram detectadas alterações nestes parâmetros, reforçando a ideia da baixa ação do CDNB neste tecido. A

ação inibitória do CDNB sobre a TrxR já foi detectada em mamíferos (HEISS; GERHÄUSER, 2005; SEYFRIED; WÜLLNER, 2007), assim como a inibição irreversível da GR por CDNB e a inibição reversível da GR pelo DNP-SG *in vitro* (BILZER et al., 1984). Desta forma, tanto o CDNB como o DNP-SG poderiam estar causando a inibição observada nas enzimas antioxidantes em brânquias de *C. gigas*. Porém, a inalteração da atividade da GR, TrxR e GST na glândula digestiva reforça a ideia de baixa entrada de CDNB neste tecido, possivelmente pela eficaz biotransformação do CDNB mediada pela brânquia (Fig. 53).

O rápido aumento na atividade GST na brânquia após 24 h sugere uma eficiente indução da transcrição gênica nas primeiras horas de exposição. Desta maneira, investigamos os níveis de transcritos de 3 isoformas de GST (omega, pi e mi) na brânquia e glândula digestiva a fim de determinar se essa modulação pode estar relacionada a um aumento na transcrição gênica. Os dados apontam para um rápido e forte aumento nos transcritos na brânquia para 2 das 3 isoformas analisadas, seguido do reestabelecimento dos níveis basais (Fig. 24). Após 4 h de exposição os níveis de transcritos aumentaram 99 vezes para a isoforma omega e 7 vezes para a pi, enquanto que a isoforma mi permaneceu inalterada. É importante ressaltar que a atividade da GST foi analisada utilizando CDNB como substrato, sendo que uma das isoformas da GST da família omega (isoforma 1) apresenta baixa atividade contra este composto, enquanto que as famílias mi e pi apresentam alta atividade contra o mesmo (IOANNIDES, 2002; WANG et al., 2005). Desta forma, os dados de atividade enzimática da GST apresentam uma resposta geral da modulação de diferentes famílias isoformas frente à uma exposição a CDNB, enquanto que os dados de transcrição gênica investigaram especificamente esta resposta em 3 isoformas de GSTs. De maneira geral, os dados reforçam a ideia da brânquia como alvo inicial do CDNB, enquanto que a glândula digestiva pode estar atuando de maneira complementar em um metabolismo mais tardio de metabólitos do CDNB (Fig. 53). Nestes tempos mais tardios conforme os dados observados, a brânquia possui baixo níveis de GSH, o que impediria uma ação eficiente de conjugação de CDNB.

Esta resposta de indução de genes e enzimas relacionadas à proteção celular tem sido detectada repetidas vezes em brânquia de bivalves. Este órgão é considerado como alvo de entrada de muitos contaminantes, podendo apresentar um perfil de indução de metalotioneínas, enzimas de biotransformação e também de enzimas antioxidantes (BEBIANNO et al., 2004). Por exemplo, ostras expostas a esgoto domésticos apresentaram maior atividade da Cat e GR

(ZANETTE et al., 2008), assim como mexilhões transplantados para regiões contaminadas por efluentes urbanos e industriais apresentaram maior atividade da Cat, GR, GPx e GST (MARIA; SANTOS; BEBIANNO, 2009). Mexilhões expostos a benzo[a]pireno também induziram a transcrição de genes relacionados a defesa antioxidante, de biotransformação e de resposta a estresse (CHÂTEL et al., 2012). A indução de genes de enzimas de biotransformação de fase I (Citocromo P450) e II (GST) também ocorreu na brânquia de ostras expostas ao HPA fenantreno, enquanto que a glândula digestiva praticamente não apresentou modulação desses genes (LÜCHMANN et al., 2014).

5.1.3. Brânquia como uma barreira metabólica efetiva contra agentes eletrofílicos

A fim de averiguar se a brânquia é capaz de proteger o organismo contra agentes eletrofílicos em ostras *C. gigas*, um conjunto adicional de experimentos foi realizado utilizando CDNB e NEM. Inicialmente, CDNB foi injetado diretamente no músculo adutor das ostras para atingir a hemolinfa (Fig. 25) e, conseqüentemente, todos os demais tecidos do organismo devido ao seu sistema circulatório aberto. As doses utilizadas (0,3-3 μmol) correspondem à quantidade de CDNB adicionado à água do mar em uma exposição nas concentrações de 0,3 a 3 μM . Não foi possível realizar exposições a maiores doses devido à baixa solubilidade do CDNB em soluções polares. Similarmente aos dados anteriores, após 24 h do início da exposição via músculo adutor, foi detectada uma diminuição nos níveis de GSH-t e na atividade da GR na brânquia, assim como um aumento na atividade GST. A glândula digestiva apresentou apenas uma leve inibição da GR, se comparado com a brânquia. É importante ressaltar que a maior dose utilizada (3 μmol) equivale apenas à aproximadamente 1/3 da quantidade de CDNB absorvido em animais expostos a CDNB 10 μM (assumindo 100% de absorção após 24 h). As alterações na brânquia e na glândula digestiva foram semelhantes àsquelas encontradas após a exposição ao CDNB na água do mar, onde as alterações são observadas principalmente na brânquia. Estes dados indicam que, mesmo através de uma exposição pela hemolinfa, o CDNB continua chegando preferencialmente na brânquia, possivelmente devido ao alto fluxo de hemolinfa neste tecido.

Hipotetizamos que o papel protetor da brânquia pode ocorrer de maneira menos eficiente, ou até mesmo desaparecer, em exposições onde esta barreira metabólica da brânquia tenha sido enfraquecida. Esta hipótese foi melhor estudada ao utilizar NEM como agente eletrofílico, ao invés de CDNB. A NEM é usada rotineiramente como um agente

alquilante de tióis como a glutationa. A NEM por ter alta reatividade com tióis, alta solubilidade em água e atravessafacilmente membranas biológicas (HAJ-YEHIA; BENET, 1996; MORRÉ; MORRÉ, 1995; MURPHY; SCHOLICH; SIES, 1992). Assim, o tratamento com NEM leva a uma rápida depleção nos níveis de GSH. Esta depleção foi comparada entre uma exposição via água do mar ou via hemolinfa (Fig. 26). Conforme o esperado, uma hora de exposição pela água do mar causou uma forte diminuição de GSH-t na brânquia, evidenciando a eficiência do protocolo. Entretanto, não foram detectadas alterações nos níveis de GSH-t na glândula digestiva, reforçando a ideia da brânquia como primeiro contato e como uma eficiente barreira contra compostos eletrofílicos. Esta ideia é corroborada pela ausência de efeito sobre os níveis de GSH-t na glândula digestiva. Os dados da exposição de NEM via hemolinfa estão de acordo com esta hipótese, onde foi observada a diminuição dos níveis de GSH-t em ambos os tecidos, porém novamente de maneira mais marcante na brânquia. Esses dados ficam mais claros quando comparamos a concentração capaz de inibir (consumir) 50% dos níveis de GSH (CI_{50}) em ambos os tecidos nos diferentes meios de exposição. No caso da NEM via água do mar, o CI_{50} para brânquia é de 32 μM , enquanto que para a glândula digestiva esse valor é 8 vezes maior (269 μM). Para a exposição via hemolinfa, o CI_{50} para a brânquia é de 3,2 μM enquanto que para a glândula digestiva esse valor é 50 vezes maior (162 μM). Estes dados indicam, de maneira consistente, que a brânquia é uma barreira metabólica contra a entrada de substâncias eletrofílicas (Fig. 53), realizando a rápida conjugação destas substâncias com GSH, diminuindo sua toxicidade e iniciando sua metabolização para posterior excreção.

A fim de interferir nessa capacidade protetora da brânquia, foi utilizado um protocolo com a exposição de ostras a NEM seguido de CDNB (ambos pela água do mar). Desta forma, era esperado bloquear parcialmente a proteção oferecida pela brânquia através da depleção de seus níveis de GSH intracelular, supostamente interferindo na capacidade de conjugação do CDNB neste tecido. Consequentemente, é esperado um aumento na biodisponibilidade do CDNB para o resto do organismo. Os dados (Fig. 27) estão de acordo com esta hipótese, onde a exposição em sequência a ambos agentes eletrofílicos causaram uma diminuição nos níveis de GSH-t na glândula digestiva, o que não foi observado quando se utilizou NEM ou CDNB individualmente na água do mar.

A brânquia é considerada como a principal rota de absorção de compostos químicos dissolvidos na água por organismos aquáticos,

principalmente pela sua ampla superfície em contato com o ambiente externo e alta taxa de troca de solutos entre água e sangue ou hemolinfa (HAYTON; BARRON, 1990). Este processo é realizado através do transporte de compostos químicos para o entorno da brânquia através do fluxo de água, seguido da difusão ou transporte destas moléculas do epitélio branquial ao sistema circulatório e distribuição ao resto do organismo (ERICKSON; MCKIM, 1990). Desta forma, é de se esperar que este órgão possua uma alta capacidade de defesa contra contaminantes presentes no meio externo, conforme já demonstrado em bivalves com proteínas de efluxo de contaminantes (LUCKENBACH; EPEL, 2008; NAVARRO et al., 2012), defesas antioxidantes (AHMAD et al., 2011) e de biotransformação (LÜCHMANN et al., 2014), de resposta à exposição a metais (GÉRET et al., 2002) e de estresse celular geral (LÜCHMANN et al., 2011). Os dados do presente trabalho reforçam a ideia de um papel central da brânquia na proteção do organismo, atuando como uma importante barreira metabólica contra agentes eletrofílicos (Fig. 53).

5.2. ESTUDO 2

Os mecanismos celulares de defesa são essenciais para o seu funcionamento, tanto em situações fisiológicas como patológicas. A eficiência desses sistemas depende tanto de seu próprio funcionamento como de sua indutibilidade durante situações de estresse celular (VASSEUR; LEGUILLE, 2004). Neste cenário, o sistema antioxidante possui um papel central na defesa celular e do organismo contra agentes oxidantes. Em bivalves este sistema pode ser modulado por diferentes fatores bióticos e abióticos, incluindo contaminantes, idade, tamanho, temperatura, salinidade e taxa metabólica (FRENZILLI et al., 2004; LAU; WONG, 2003; REGOLI et al., 2000; SHEEHAN; POWER, 1999; SUKHOTIN; ABELE; PRTNER, 2002). Dessa forma, é possível que a eficiência do sistema antioxidante seja diferente em cada um desses cenários, aumentando ou diminuindo a susceptibilidade a eventos oxidativos.

5.2.1. Pré-tratamento com $ZnCl_2$ e CDNB em mexilhões e ostras

As consequências biológicas da inibição da enzima GR foram investigadas em mexilhões *P. perna* após uma exposição aguda (18 h) ao $ZnCl_2$ (40 μM). Esta concentração afetou a atividade da GR sem alterar a atividade enzimática da TrxR (Fig. 28) ou os níveis intracelulares de -SH (Fig. 34). O decréscimo da atividade GR por $ZnCl_2$ já foi reportada por nosso grupo em mexilhões, carpas e ratos (FRANCO et al., 2006, 2008a, 2008b; TREVISAN et al., 2014). A

ligação do zinco com grupos -SH da enzima leva a sua inativação, conforme demonstrado previamente em estudos *in vitro* (MIZE; LANGDON, 1962). Este efeito do zinco sobre a GR já foi relacionado com a toxicidade deste metal em células neuronais e de pulmão, causando distúrbios no estado tiólico intracelular (BISHOP; DRINGEN; ROBINSON, 2007; MITOZO et al., 2011; WALTHER et al., 2000). Além disso, $ZnCl_2$ também causou um forte decréscimo na atividade da TrxR nas concentrações de 50 e 100 μM (Fig. 28), conforme já demonstrado em trabalhos com mamíferos (BRAGADIN et al., 2004; GAZARYAN et al., 2007). Estes dados apontam a GR e TrxR como importantes alvos da toxicidade de zinco em bivalves marinhos.

Um segundo objetivo deste estudo foi investigar a importância das Prx na proteção celular contra agentes oxidantes em mexilhões e ostras. Prx são peroxidases com uma alta velocidade de reação, comparável com a GPx, sendo considerada uma das principais peroxidases, tanto na mitocôndria como no citosol (PESKIN et al., 2007; RHEE et al., 2012; SIES, 2014). Conforme apresentado na seção 1.1, estas enzimas atuam em conjunto com a Trx e TrxR (com exceção da Prx6) como um sistema doador de elétrons. De maneira semelhante à estratégia utilizada para afetar a GPx (via inibição da GR), foi utilizado o CDNB a fim de diminuir a atividade da enzima TrxR (HEISS; GERHÄUSER, 2005; SEYFRIED; WÜLLNER, 2007), e com isto comprometer o ciclo catalítico da Prx. O CDNB é um conhecido inibidor da TrxR, o qual provavelmente age alquilando o grupo -SH reativo do sítio ativo da enzima (ARNÉR; BJÖRNSTEDT; HOLMGREN, 1995). A concentração de CDNB de 10 μM afetou tanto a atividade GR como TrxR e depletou os níveis de GSH-t em mexilhões e ostras (Figs. 28, 29, 34 e 35). Devido a esta ação indiscriminada do CDNB, afetando a GSH, GR e TrxR, não foi possível distinguir entre os efeitos causados nos ciclos catalíticos da GPx ou da Prx. A forte inibição da TrxR causaria um efeito direto na atividade da Prx, assim como a inibição da GR, seguido do consumo de GSH, também causaria uma diminuição na velocidade do ciclo catalítico da GPx. Em conjunto, pode-se assumir que os animais pré-expostos a CDNB apresentariam um sistema antioxidante fortemente suprimido, com dois sistemas peroxidáticos (GPx/GSH/GR e Prx/Trx/TrxR) operando de maneira deficiente (Figs. 54 e 55).

5.2.2. Efeitos do $ZnCl_2$ e CDNB na taxa de degradação de peróxido *in vivo*

É esperado que um decréscimo na atividade da GR afete a velocidade do ciclo catalítico da GPx (Fig. 54), uma vez que a regeneração de GSH a partir da GSSG está comprometida (DICKINSON; FORMAN, 2002). Desta forma, era esperado que mexilhões pré-expostos a $ZnCl_2$ e expostos a CHP apresentassem uma menor capacidade de detoxificação de peróxido, o que foi testado *in vivo* (Fig. 31). Para animais controle, após duas horas de exposição a CHP 50 μM , os valores de peróxido na água do mar foram 4% dos valores iniciais, enquanto para animais pré-expostos a $ZnCl_2$ este valor era 2,5 vezes maior. A análise da AAC também aponta para este efeito do $ZnCl_2$, o qual causa um aumento de 44% na AAC. Dados semelhantes foram observados em animais expostos a CHP 100 μM , reforçando esta hipótese.

No caso de mexilhões e ostras expostos a CDNB, também foi observada uma menor taxa de degradação de peróxido *in vivo*. Em mexilhões (Fig. 31), os níveis de CHP foram 6 vezes maiores nos animais expostos a CHP 50 μM do que nos animais controle. Os valores da AAC também demonstram o forte efeito do CDNB no organismo, o qual aumentou estes valores em 108%. Dados semelhantes foram observados em animais expostos a CHP 100 μM , reforçando esta hipótese. Para ostras (Fig. 32), com uma capacidade de degradar aproximadamente 6,8 μmol de CHP por hora, o CDNB foi capaz de diminuir essa taxa de degradação para 4,7 μmol de CHP por hora, indicando que o constante fornecimento de elétrons para o sistema peroxidático pode ter sido afetado. Este dado leva a supor que os efeitos de consumo de GSH-t e inibição da GR e TrxR foram capazes de afetar a capacidade peroxidática de ambas espécies de bivalves (Figs. 53 e 54).

GPx e Cat são consideradas as principais enzimas de metabolização de peróxidos, (MUELLER; RIEDEL; STREMMEL, 1997; TOPPO et al., 2009), entretanto as Prxs têm sido consideradas recentemente como outra importante via de degradação de peróxidos pela célula (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). Em bivalves, já foi demonstrado que diferentes isoformas das Prxs são moduladas em situações de estresse, como infecções bacterianas, hipóxia, agitação mecânica, temperatura e contaminantes ambientais (DAVID; TANGUY; MORAGA, 2007; GENARD et al., 2013; KUCHEL; NAIR; RAFTOS, 2012; PARK et al., 2008). Porém, ainda não existem estudos investigando a influência destas enzimas (assim como das GPx) na detoxificação de peróxidos por estes organismos. No presente estudo, é

estimado que a GPx e as 3 classes de Prx (1-Cys, 2Cys típica e atípica) estejam operando com uma menor capacidade, devido ao comprometimento de seus sistemas complementares (GSH/GR e Trx/TrxR), gerando uma menor taxa de degradação de peróxidos, o que pode ser detectada em mexilhões e ostras pré-expostas ao CDNB (Fig. 53 e 54).

5.2.3. Efeitos do ZnCl₂ e CDNB em hemócitos de mexilhões e ostras expostas a agentes oxidantes

Invertebrados dependem do sistema imunológico para lidar com invasões de micro-organismos, possuindo hemócitos como as principais células efectoras. Análises de hemócitos são amplamente utilizadas em estudos ecotoxicológicos como indicadores do estado de saúde dos organismos (MYDLARZ; JONES; HARVELL, 2006). A fim de investigar as consequências do tratamento com ZnCl₂, CDNB ou CHP, o que levou à diminuição da atividade das enzimas GR e TrxR foram realizadas análises de densidade celular e de viabilidade em hemócitos de mexilhões *Perna perna* (Fig. 36). Alterações na densidade celular podem ocorrer devido a diversas alterações ambientais, incluindo exposição a contaminantes (GALLOWAY; DEPLEDGE, 2001). Entretanto, este parâmetro não foi afetado em animais pré-expostos a ZnCl₂, CDNB ou CHP, quando administrados individualmente. Porém, animais pré-expostos a ZnCl₂ e posteriormente expostos a CHP 100 µM apresentaram um maior número de hemócitos circulantes, indicando um efeito sinérgico de ambos compostos. Uma vez que a exposição a CHP foi curta (2 h), essa alteração não deve estar relacionada com uma maior produção de hemócitos, mas sim a sua migração para a hemolinfa a partir de outros tecidos. Esta é uma resposta a situações de estresse, um mecanismo adaptativo já detectado em mexilhões expostos a cobre (PIPE et al., 1999.).

O pré-tratamento com ZnCl₂, seguido de exposição ao CHP, ou o tratamento somente com CHP, não afetaram a viabilidade celular dos hemócitos. Em contrapartida, a viabilidade celular dos hemócitos, medida pela redução do MTT, foi reduzida devido ao sinergismo entre CDNB e CHP 100 µM. Este dado sugere que a menor atividade de enzimas antioxidantes na brânquia pode permitir que maiores níveis de CHP cheguem à hemolinfa, afetando negativamente a viabilidade celular dos hemócitos (Fig. 54).

Para ostras *C. gigas*, a relação entre a proteção mediada pelo sistema de defesa antioxidante e as células do sistema imunológico foi investigada utilizando-se Men como composto oxidante modelo (Fig.

37). Ostras do grupo CDNB/AM (expostas a CDNB seguido de 24 h em água do mar) apresentaram uma diminuição na viabilidade celular de hemócitos, detectado pelo ensaio do vermelho neutro. Este dado indica que os hemócitos de ostras são sensíveis a compostos eletrofilicos, enquanto que compostos oxidantes (*e. g.* Men) não causaram efeitos na viabilidade celular. Entretanto, compostos capazes de gerar ERO geralmente possuem uma alta capacidade de causar danos ao DNA, o que foi confirmado em hemócitos de ostras expostas a Men. O pré-tratamento com CDNB, causando distúrbio no sistema antioxidante, também foi capaz de causar danos ao DNA de hemócitos, mesmo na ausência de Men. Com exceção do grupo controle, todos os tratamentos apresentaram valores de dano ao DNA próximos de 300 (de uma escala de 0-400), o que é considerado como um alto nível de danos ao DNA.

Estes resultados indicam que pode haver uma importante relação entre o sistema de defesa antioxidante e o sistema imunológico em bivalves, uma vez que o $ZnCl_2$ e o CDNB foram capazes de afetar ambos os sistemas. Inclusive, enzimas antioxidantes têm sido relacionadas com um papel imunológico em bivalves, como a SOD extracelular e Prx6. A primeira é capaz de se ligar a lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas, facilitando seu reconhecimento, enquanto que a segunda, quando expressa em menores níveis, confere maior resistência a protozoários, possivelmente por permitir maior acúmulo de ERO durante processos fagocíticos (GONZALEZ et al., 2005; GREEN; BARNES, 2009). Diversos xenobióticos causam imunossupressão em bivalves (CAJARAVILLE; OLABARRIETA; MARIGOMEZ, 1996; GAGNAIRE et al., 2006; GALLOWAY; DEPLEDGE, 2001; KOUKOUZIKA; DIMITRIADIS, 2005), e devido ao papel central dos hemócitos para a manutenção da saúde dos organismos, o distúrbio deste sistema pode tornar os organismos mais susceptíveis a patógenos, comprometendo seus sistemas de defesa e sobrevivência.

5.2.4. Efeitos do $ZnCl_2$ e CDNB sobre o estado tíolico de mexilhões e ostras expostos a agentes oxidantes

Em mexilhões expostos apenas a CHP, um resultado interessante detectado neste estudo foi o aumento nos níveis de GSH-t e PSH após exposição por um curto período de tempo (2 h), sem alterar os níveis de GSSG (Fig. 34). Exposições mais prolongadas a agentes oxidantes, como chumbo, paraquat (uma quinona usada como pesticida) ou HPA já foram descritos como indutores da síntese de GSH (DAFRE et al., 2004; GRAVATO; OLIVEIRA; SANTOS, 2004). Em eucariotos, a indução de genes relacionados à síntese de GSH, ou a outros agentes de detoxificação, pode ser mediada através da via de transcrição do Nrf2.

Esta via é ativada durante condições iniciais de estresse oxidativo ou eletrofílico, ocasionando um aumento na proteção celular. Desta forma, é possível inferir que este padrão de resposta detectado em mexilhões expostos a CHP também ocorra por esta via. Apesar de já ter sido descrito em peixes (ALMEIDA et al., 2010; GIULIANI; REGOLI, 2014), ainda não existe nenhum trabalho caracterizando esta via de transcrição em bivalves, ou ainda demonstrando proteínas alvos desta via. Entretanto, estresse oxidativo/eletrofílico mais prolongado ou de maior intensidade pode causar efeitos acumulativos. Nestas situações, não há ativação da via do Nrf2, mas sim de vias de sinalização relacionadas com distúrbios ou morte celulares (KASPAR; NITURE; JAISWAL, 2009).

Ao contrário do esperado, os níveis de GSSG não foram afetados em mexilhões pela exposição a CHP e/ou $ZnCl_2$ (Fig. 34). Este mesmo padrão já foi detectado em mamíferos ou culturas de células tratadas com zinco, mesmo apresentando inibição da GR (BISHOP; DRINGEN; ROBINSON, 2007; FRANCO et al., 2008a). É possível que este acúmulo não ocorra devido ao exporte do excesso de GSSG para o meio extracelular, o qual pode ser feito através de proteínas de exporte do tipo ABC (DRINGEN; HIRRLINGER, 2003; ELLISON; RICHIE JR., 2012). Neste contexto, um aumento na expressão da glicoproteína P, uma proteína transportadora do tipo ABC, já foi reportada em mexilhões *P. perna* expostos a zinco (FRANCO et al., 2006). Apesar da glicoproteína P não estar diretamente relacionada com o exporte de GSSG, é possível que outras proteínas transportadoras do tipo ABC estejam sendo induzidas após exposição a $ZnCl_2$, evitando assim um acúmulo de GSSG no meio intracelular.

A depleção de GSH-t e GSSG em brânquias de mexilhões após exposição ao CDNB pode estar relacionado ao consumo de GSH por reações de conjugação com o CDNB, conforme sugerido no estudo anterior (vide seções 5.1,1 e 5.1.2) e reportado em experimento *in vitro* com células de mamíferos (HAN et al., 2003; KRANCE et al., 2010; REDDAN et al., 1999). Ao longo de uma exposição a CDNB, a redução da GSSG pela GR gera duas novas moléculas de GSH que podem ser rapidamente consumidas pela conjugação com CDNB, consequentemente diminuindo os níveis de GSH-t e de GSSG. Nesta situação, é possível que uma exposição a peróxido não levaria a um acúmulo de GSSG por não haver GSH disponível para ser utilizada na degradação do peróxido.

A fim de verificar a hipótese de que um distúrbio no sistema antioxidante iria afetar a susceptibilidade de ostras aos efeitos tóxicos do

agente oxidante Men, um experimento adicional foi montado através da pré-exposição de ostras ao CDNB 10 μM por 18 h, seguido de Men 1 mM por 24 h (CDNB/Men) e os níveis de GSH-t e PSH foram avaliados nas brânquias. Grupos de ostras expostas apenas a Men (AM/Men) ou ao CDNB (CDNB/AM) também foram investigados. Animais do grupo CDNB/AM apresentaram um reestabelecimento dos níveis de GSH-t e PSH (Fig. 35) se comparado com os efeitos somente da exposição a CDNB por 18 h, o qual leva a uma marcante depleção nos níveis de GSH (dados não apresentados). A exposição somente a Men (grupo AM/Men) não foi capaz de alterar os níveis de GSH-t e PSH. Entretanto, animais pré-expostos ao CDNB, seguido de exposição a Men (grupo CDNB/Men), além de não conseguirem induzir o reestabelecimento de GSH-t e PSH, apresentaram depleção quase total de GSH-t (96%), reforçando a hipótese de que o CDNB é capaz de potencializar a toxicidade da Men em ostras *C. gigas* (Fig. 55).

Aproximadamente 30% dos níveis de PSH diminuíram após a exposição ao CDNB por 18 h. Este dado demonstra que tanto GSH como PSH são alvos *in vivo* de ataques de xenobióticos em bivalves, principalmente quando os níveis de GSH estão baixos. O mecanismo envolvido nesta diminuição nos níveis de PSH não está claro, mas pode estar relacionado com a formação de pontes dissulfeto inter e intramoleculares, incluindo processos de glutationilação. Este processo é responsável pela formação de dissulfetos mistos entre a GSH e proteína, os quais geralmente são formados em cisteínas mais reativas, e portanto, sensíveis a estresse oxidativo. A ligação com GSH através de ponte dissulfeto é uma forma reversível e uma maneira de evitar modificações oxidativas irreversíveis (GHEZZI, 2013). A remoção da GSH pode ser realizada posteriormente quando o ambiente celular voltar ao seu estado redutivo normal, e pode ser catalisada através da enzima glutaredoxina (GREK et al., 2013). Este processo de glutationilação já foi demonstrado em bivalves em situações fisiológicas e patológicas (MCDONAGH; SHEEHAN, 2006). Foi demonstrado que a actina é uma proteína alvo para processos de glutationilação em bivalves (DAILIANIS; PATETSINI; KALOYIANNI, 2009; MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005) assim como em mamíferos (CHOONG et al., 20013; SAKAI et al., 2012), porém diversas outras proteínas também podem ser glutationiladas em bivalves (MCDONAGH; SHEEHAN, 2007). É importante ressaltar que a glutationilação de proteínas pode ocorrer de maneira marcante em brânquias, quando comparada a outros tecidos. A glutationilação em proteínas das brânquias tem sido considerada um potencial biomarcador dos efeitos de

contaminantes em bivalves marinhos (MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005).

Algumas proteínas possuem cisteínas reativas, especialmente proteínas abundantes como actina, presente em vários tipos celulares, e hemoglobina e anidrase carbônica nos eritrócitos (DALLE-DONNE et al., 2009; REISCHL et al., 2007; THOMAS; POLAND; HONZATKO, 1995). Foi sugerido que estas cisteínas reativas de proteínas abundantes possam atuar como importante defesa antioxidante celular (DALLE-DONNE et al., 2009; REISCHL et al., 2007; THOMAS; POLAND; HONZATKO, 1995). Estas proteínas abundantes que apresentam grupos -SH reativos, podem atuar neutralizando ERO e interceptando moléculas tóxicas, ação que poderiam proteger outros alvos celulares. Os tióis protéicos podem atuar em conjunto com o sistema de biotransformação de fase II para proteger funções celulares essenciais (DALLE-DONNE et al., 2009; REISCHL et al., 2007; ROSSI et al., 2001).

5.2.5. Efeitos do $ZnCl_2$ e CDNB sobre a sobrevivência de mexilhões e ostras expostas a agentes oxidantes

A fim de investigar se o distúrbio no sistema antioxidante causado por $ZnCl_2$ e CDNB poderia deixar o organismo mais susceptível à toxicidade do CHP, curvas de sobrevivência foram determinadas para estimar a $CL_{50}(96\text{ h})$. Em mexilhões o valor da $CL_{50}(96\text{ h})$ para o CHP foi de $550\ \mu\text{M}$ (Fig. 30). Possivelmente, a menor taxa de detoxificação de CHP causada por $ZnCl_2$ e CDNB leva a um acúmulo do mesmo nos tecidos do organismo, o que pode ser responsável pelo aumento de sua toxicidade, e eventualmente, levando à morte do organismo. Desta forma, animais pré-expostos a $ZnCl_2$ e CDNB foram expostos a CHP 100 e $300\ \mu\text{M}$ por 96 h e a taxa de mortalidade foi comparada com animais controle expostos somente ao CHP. Ambos os compostos aumentaram a taxa de mortalidade induzida por CHP durante a exposição, sendo o CDNB o responsável pelos maiores efeitos (Fig. 30). Estes dados estão de acordo com os demais resultados deste estudo, sugerindo que a disfunção nos sistemas peroxidáticos da GPx e da Prx, ocasionado pela menor atividade das enzimas GR e TrxR, torna os organismos mais sensíveis aos efeitos de agentes oxidantes como peróxidos orgânicos (Fig. 54).

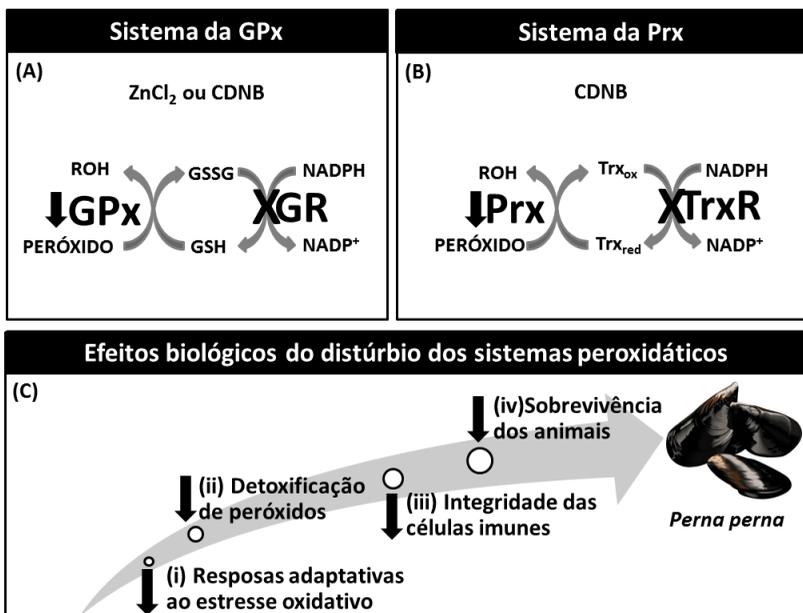


Figura 54: Hipótese levantada sobre os efeitos da inibição das enzimas glutatona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR) por zinco ($ZnCl_2$) ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em mexilhões *Perna perna*. Ao utilizar $ZnCl_2$ (A), ocorre decréscimo na atividade GR, enquanto que o CDNB (A e B) causa redução na atividade da GR como da TrxR, além de depleção dos níveis de glutatona (GSH). Além disso, ambos os compostos bloqueiam a síntese de GSH durante exposição aguda a peróxido orgânico. Desta forma, os animais (C) possuem uma (i) menor resposta adaptativa ao estresse oxidativo, (ii) diminuindo sua capacidade de detoxificação *in vivo* de peróxido orgânico. Como consequência, pode ocorrer um acúmulo de peróxido no organismo, (iii) afetando a integridade das células imunes, e posteriormente (iv) levando à morte do organismo. ROH = álcool derivado da redução de peróxidos orgânicos; GSSG = dissulfeto de glutatona; GPx = glutatona peroxidase; Prx = peroxirredoxina; Trx_{red} = tiorredoxina reduzida; Trx_{ox} = tiorredoxina oxidada.

A fim de melhor caracterizar a capacidade oxidante da Men em ostras *C. gigas*, foram investigadas as vias de redução de quinonas por 1 ou 2 elétrons, assim como os efeitos do CDNB em enzimas responsáveis por essa metabolização (Fig. 33). Foi observado que, apesar de as ostras possuírem uma atividade do tipo Men redutase, esta não foi inibida na presença de dicumarol, um clássico inibidor da enzima DT-diaforase. Isto indica que a via de redução não é mediada pela transferência de dois elétrons. Por outro lado, a inibição quase completa da atividade da

enzima NAD(P)H citocromo c redutase na presença de SOD purificada aponta para uma importante rota de redução de quinonas pela via de 1 elétron, ou seja, uma via mediada pela formação de radicais livres. Esses dados diferem dos demais resultados encontrados com mexilhões *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *D. polymorpha* e *P. viridis* (CHEUNG et al., 2001; FERNÁNDEZ et al., 2010; LIVINGSTONE; GARCIA MARTINEZ; WINSTON, 1989; OSMAN et al., 2004), onde a DT-diaforase foi detectada em brânquias e glândula digestiva como principal via de redução de Men (LIVINGSTONE; GARCIA MARTINEZ; WINSTON, 1989; OSMAN et al., 2004). Desta forma, ao contrário dos mexilhões que são capazes de reduzir quinonas a metabólitos pouco reativos (vide Fig. 15), ostras *C. gigas* aparentam reduzir quinonas preferencialmente pela via de 1 elétron, potencial via geradora de intermediários de maior toxicidade (semiquinonas), os quais, por sua vez, são capazes de gerar ciclos redox e gerar ERO, atuando como moléculas oxidantes.

Um experimento adicional foi realizado a fim de investigar se o CDNB era capaz de aumentar a mortalidade causada por Men em *C. gigas*. Animais expostos a Men 300 μ M apresentaram uma baixa mortalidade (aproximadamente 20%), enquanto o CDNB não produziu mortalidade durante todo o período de exposição. Por outro lado, o pré-tratamento com o CDNB foi capaz de aumentar a mortalidade induzida por Men, que passou de 20% para aproximadamente 70% em 96h de exposição. Baseado nestes dados é possível hipotetizar que a geração de ERO durante a redução de Men via um elétron torna-se demasiadamente tóxica na presença de um sistema antioxidante comprometido, como é o caso de animais pré-expostos ao CDNB. Além disso, é conhecido que quinonas podem formar adutos com glutathiona (vide Fig. 15) e cisteína, o que permite que, posteriormente, sejam excretadas da célula. Este mecanismo pode explicar o consumo excessivo de GSH-t e também o não reestabelecimento de PSH em brânquias de ostras do grupo CDNB/Men.

Neste estudo foi observado que o agente eletrofílico CDNB também é capaz de afetar o sistema antioxidante e células do sistema imunológico de ostras *C. gigas*, causando consumo de GSH, diminuição da atividade das enzimas GR e TrxR e provocando distúrbios celulares em hemócitos. Os dados indicam que o metabolismo de quinonas em *C. gigas* ocorre preferencialmente pela via dependente da redução por um elétron. Esta via é classicamente conhecida com uma fonte de produção do radical superóxido (OBRIEN et al., 1991). Os dados indicam que o distúrbio no sistema antioxidante causado pelo CDNB diminui a

proteção destes animais contra ERO, aumentando, assim, a toxicidade desta quinona para esta espécie (*C. gigas*). Estes dados reforçam a ideia de que os sistemas de biotransformação e antioxidante atuam em conjunto na proteção dos organismos contra diversos agentes tóxicos (Fig. 55).

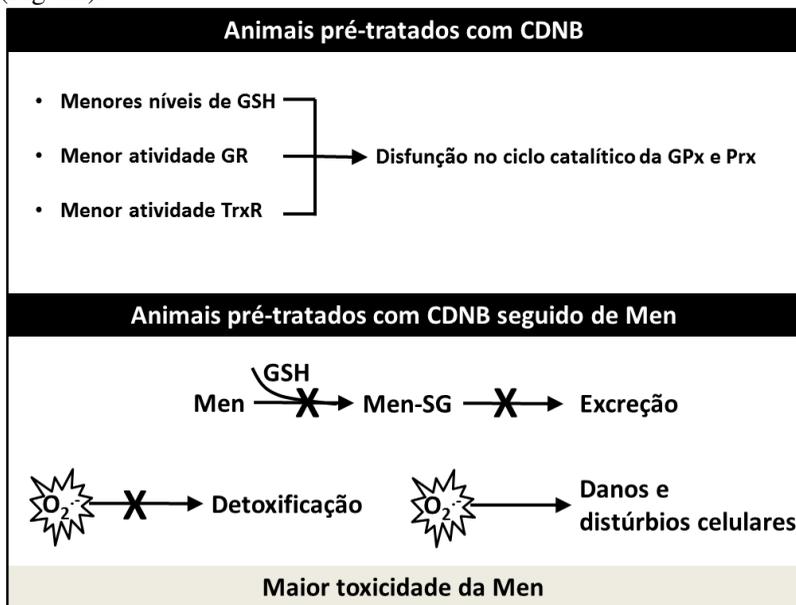


Figura 55: Hipótese levantada sobre os efeitos da inibição do sistema antioxidante causado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) na toxicidade da menadiona (Men) em ostras do Pacífico *Crassostrea gigas*. No painel de cima, animais tratados com CDNB apresentaram menores níveis de glutatona (GSH) assim como menor atividade glutatona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR), causando uma menor capacidade de detoxificação de peróxidos devido ao ineficiente ciclo catalítico das peroxidases glutatona peroxidase (GPx) e peroxirredoxina (Prx). No painel de baixo, animais tratados com CDNB e Men apresentaram uma maior susceptibilidade à toxicidade da Men, possivelmente pela menor capacidade de excreção de Men via conjugação com GSH, causando seu acúmulo. A redução da Men neste organismo ocorre preferencialmente por uma via de um elétron, causando ciclos redox consecutivos e gerando ânion superóxido (O_2^-). A proteção celular contra O_2^- e outras espécies reativas de oxigênio está comprometida devido a menor atividade das enzimas antioxidantes, permitindo a ocorrência de maiores danos e distúrbios celulares, e conseqüentemente, aumentando a toxicidade da Men durante sua biotransformação.

5.3. ESTUDO 3

A quantificação de ZnONP no ambiente aquático ainda não é uma prática comum, assim como para outros nanomateriais. Porém, modelos matemáticos foram desenvolvidos a fim de estimar os níveis de ZnONP em águas de superfície tanto na Europa como nos EUA (Gottschalk et al., 2009). Estes valores ficam na faixa de 1 a 10 ng/L, podendo chegar a valores mais elevados no caso de esgoto liberado de estações de tratamento (300-432 ng/L). No caso de zinco solúvel, as concentrações estimadas ficam na faixa de nanomolar, podendo chegar a concentrações mais elevadas na ordem de micromolar em áreas contaminadas (GARCÍA-NEGRETE et al., 2013; GOWD; GOVIL, 2008; VOETS et al., 2009). Apesar das concentrações de ZnONP utilizadas neste estudo provavelmente ainda não serem encontradas em águas naturais, sua utilização permite identificar concentrações tóxicas e letais para bivalves, assim como compreender seu modo de ação (toxicidade e destino). Estas são informações importantes ainda não disponíveis, uma vez que este é um dos primeiros ensaios toxicológicos com ZnONP em bivalves marinhos. Os dados obtidos neste trabalho estão sumarizados na Figura 56 e estão discutidos ao longo desta seção.

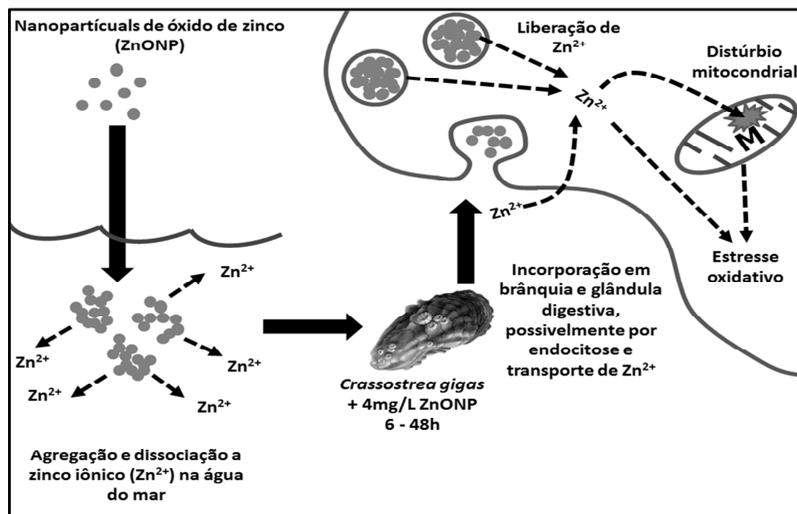


Figura 56: Hipótese levantada sobre os efeitos de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) em ostras do Pacífico *Crassostrea gigas*. A adição de ZnONP na água do mar causa rápida agregação das nanopartículas em paralelo a dissociação em zinco iônico (Zn²⁺). Ostras expostas a ZnONP apresentaram acúmulo de zinco primeiramente na brânquia e em seguida na glândula

digestiva. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram a presença de vesículas endocíticas contendo material elétron denso, indicando a possibilidade da incorporação de nanopartículas via endocitose. O Zn^{2+} liberado na água do mar durante a exposição também pode ser absorvido pelo organismo através de proteínas transportadoras. Ao alcançar o citoplasma, o zinco pode agir induzindo peroxidação lipídica, inibição e oxidação de proteínas, ou ainda atingir a mitocôndria (M) causando danos oxidativos, alterações estruturais e possivelmente geração de espécies reativas de oxigênio. Os dados sugerem que ZnONP geram uma situação de estresse oxidativo moderado, especialmente na brânquia, sendo as mitocôndrias importantes alvos da toxicidade destes compostos.

5.3.1. Caracterização e toxicidade aguda e incorporação de ZnONP

Antes da exposição dos organismos a ZnONP, as nanopartículas foram caracterizadas por MET e espalhamento dinâmico da luz a fim de confirmar seu tamanho dentro da escala nanométrica (Fig. 38). As análises de MET indicaram que a maior parte das ZnONP (mais de 60%) apresentaram um tamanho das partículas primárias entre 20 e 40 nm, enquanto que menos de 1% apresentou tamanho maior que 80 nm. Entretanto, a dispersão de ZnONP apresentou um comportamento de agregação em água do mar, gerando complexos particulados (Fig. 38). Este comportamento foi melhor caracterizado através dos resultados de espalhamento dinâmico da luz, o qual confirmou o tamanho nanométrico das ZnONP em DMSO e o tamanho micrométrico na água do mar (1-2 μ m). Além disso, as análises químicas apontaram para uma alta taxa de dissociação de ZnONP em Zn^{2+} quando em água do mar (51 – 78% dos níveis totais de zinco), sugerindo um possível papel do zinco iônico na toxicidade das ZnONP, assim como numa possível precipitação de ZnONP devido à agregação (Fig. 56).

A fim de elucidar os mecanismos de toxicidade de ZnONP, *C. gigas* foram expostas a uma concentração sub-letal de ZnONP (4 mg/L) por 6, 24 e 48 h. Análises químicas (Fig. 40) da brânquia e glândula digestiva indicam que as ZnONP (assim como Zn^{2+}) são inicialmente incorporadas na brânquia, apesar de também serem acumuladas na glândula digestiva (Fig.56). Alguns estudos sugerem que a incorporação de nanopartículas em bivalves ocorre preferencialmente por órgãos digestivos (AL-SUBIAI et al., 2012; GARCÍA-NEGRETE et al., 2013; JOUBERT et al., 2013; MOORE, 2006; TEDESCO et al., 2010a), entretanto já foi demonstrado que as brânquias também podem ser alvo das nanopartículas (KOEHLER et al., 2008). Estes dados indicam que a taxa de acumulação, rotas de incorporação e distribuição de

nanopartículas são fatores essenciais para serem investigados a fim de caracterizar seus níveis de toxicidade em bivalves.

Sem a habilidade de atravessar membranas biológicas e sem a presença de transportadores conhecidos, as nanopartículas devem ser incorporadas através de eventos celulares como endocitose (MOORE, 2006). Foi observada a presença de partículas elétron-densas dentro de vesículas, tanto na brânquia como na glândula digestiva de animais expostos a ZnONP (Figs. 41 e 42), corroborando com a ideia de possíveis eventos de endocitose (Fig. 56), apesar de não ser um resultado conclusivo. A alta taxa de dissociação a Zn^{2+} na água do mar também pode levar a um aumento na incorporação de zinco nos tecidos (Fig. 56).

Os ensaios de toxicidade aguda (96 h) realizados com ZnONP e $ZnCl_2$ em *C. gigas* (Fig. 37) estão de acordo com a hipótese de que o zinco iônico influencia na toxicidade das ZnONP: a $LC_{50}(96\text{ h})$ de ambas as formas de zinco (nanoparticulada ou iônica) são semelhantes, com valores entre 26 e 30 mg de zinco/L. Os dados disponíveis a respeito da toxicidade de ZnONP em invertebrados e vertebrados aquáticos indicam que, apesar de variáveis, os valores de $CL_{50}(96\text{ h})$ estão geralmente na faixa de mg/L: 0.85 mg/L para o copépodo *Tigriopus japonicas* (WONG et al., 2010), 1.19 mg/L para o anfípoda *Elasmopus rapax* (WONG et al., 2010), 3.97 mg/L para o peixe *Danorerio* (YU et al., 2011), 42.67 mg/L para o gastrópode *Lymnaea luteola* (ALI et al., 2012). Outros estudos falharam em detectar uma concentração de ZnONP capaz de causar 50% de mortalidade mesmo com concentrações como 50 e 100 mg/L para carpas e camarões, respectivamente (ATES et al., 2012; HAO; CHEN, 2012), sugerindo que a toxicidade de ZnONP pode ser extremamente variável dependendo das suas propriedades físico-químicas e da susceptibilidade das espécies em questão, assim como da liberação de Zn^{2+} para o meio de exposição.

Os resultados de MET demonstraram a presença de partículas elétron-densas envoltas por membranas lipídicas, como vesículas endocíticas (Figs. 41 e 42), mas não livres no citosol. Isto sugere que estas vesículas estão sendo incorporadas por endocitose, apesar de não ser possível descartar a possibilidade de que estas partículas sejam um artefato da coloração. A enzima citosólica GR apresentou uma menor atividade (Fig. 44), assim como as mitocôndrias apresentaram distúrbios estruturais após exposição a ZnONP. Baseado em resultados com mexilhões (FRANCO et al., 2006; TREVISAN et al., 2014) que mostraram que a GR pode ser inibida por zinco solúvel e que

mitocôndrias de mamíferos são alvos principais da toxicidade de zinco iônico (BOSSY-WETZEL et al., 2004), os dados sugerem que íons de zinco estão chegando ao citosol e nas mitocôndrias possivelmente através de dois processos (Fig. 56): (i) dissolução de ZnONP dentro de vesículas ácidas como endossomos e lisossomos, seguido de extravasamento para o citosol; ou (ii) dissociação de ZnONP na água do mar, durante exposição, levando a incorporação de zinco iônico para o citosol através de proteínas transportadoras.

5.3.2. Efeito da exposição à ZnONP em hemócitos

Após a incorporação de nanopartículas por tecidos como a brânquia e glândula digestiva, estes compostos podem atingir a hemolinfa e afetar o sistema imunológico. Diferentes estudos *in vitro* com hemócitos e nanopartículas de carbono ou de metais demonstraram perda de viabilidade celular e de atividade fagocítica, aumento na produção intra ou extracelular de ERO e distúrbios mitocondriais (CANESI et al., 2008, 2010; CIACCI et al., 2012). No caso de mexilhões *D. polymorpha*, uma exposição aguda (24 h) *in vivo* a nanopartículas de dióxido de titânio (0,1 – 25 mg/L) demonstrou a internalização dessas nanopartículas em hemócitos, causando uma menor capacidade fagocítica e alterações em vias de sinalização da ERK ½ e p38 (COULEAU et al., 2012). De maneira inesperada, análises funcionais de hemócitos durante exposição *in vivo* (dados não apresentados) não indicaram nenhum efeito adverso de ZnONP em hemócitos de *C. gigas*. A densidade e viabilidade celular, produção de ERO, atividade fagocítica e taxa de adesão permaneceram inalterados, indicando que o sistema imune destes organismos não é afetado durante o período de 48 h de exposição à ZnONP. Apesar de já ter sido descrito que ZnONP afetam hemócitos de mexilhões *M. galloprovincialis*, causando aumento na produção de ERO e distúrbios mitocondriais, no presente estudo isso não foi detectado. É possível que os eventos imunológicos ocorram em outro período de tempo, ou então que no desenho experimental utilizado, a concentração de ZnONP capaz de atingir a hemolinfa não seja alta o suficiente para atingir o limiar de dano ao sistema imune desta espécie.

5.3.3. Alterações citosólicas causadas por ZnONP

Alguns sinais de estresse oxidativo foram evidenciados no ambiente citosólico de ostras *C. gigas* durante exposição a ZnONP (Fig. 56): menores níveis de PSH (Fig. 43) e maiores níveis de TBARS (Fig. 44), ambos na brânquia, enquanto que nenhum efeito foi observado na

glândula digestiva. É importante observar que os valores de PSH e TBARS do grupo controle 48 h foram significativamente diferentes do grupo controle 24 h, não sendo possível excluir a possibilidade de que isso tenha afetado os resultados estatísticos, tornando mais difícil interpretar os efeitos oxidativos do ZnONP neste estudo. Entretanto, a análise dos níveis gerais de oxidação de -SH e de carbonilação de proteínas citosólicas, analisadas por 1DE-SDS PAGE utilizando marcadores fluorescentes, não identificou alterações significativas para ambos os parâmetros (dados não apresentados). Essa diferença de resultados entre o ensaio colorimétrico e o ensaio fluorescente para a detecção dos níveis de PSH reduzidos pode estar relacionada à variação apresentada pelo grupo controle 24 h no ensaio colorimétrico. Independentemente, os resultados indicam a prevalência de um cenário pró-oxidante leve a moderado no citosol.

Tiós de proteínas têm sido considerados como um importante mecanismo de defesa celular, contribuindo quantitativamente para o tamponamento redox celular. Eles são susceptíveis a oxidação por ERO, temporária ou definitivamente, afetando as funções biológicas das proteínas que os contém (KILEY; STORZ, 2004; LEICHERT et al., 2008; REISCHL et al., 2007). A análise da oxidação de -SH reativos de proteínas tem sido utilizada em bivalves marinhos como uma importante ferramenta para avaliação dos efeitos tóxicos de diferentes químicos, como metais, nanopartículas, quinonas e polifenóis (ŁABIENIEC; GABRYELAK, 2006; MCDONAGH; SHEEHAN, 2008; TEDESCO et al., 2010a, 2010b; TREVISAN et al., 2011). Estes dados indicam que a oxidação de proteínas pode ser usada como um marcador de toxicidade de poluentes ambientais. Processos de peroxidação lipídica também são comumente reportados como consequência da exposição a agentes oxidantes, podendo causar alterações nas membranas celulares e morte celular (GIROTTI, 1998). Vários estudos indicaram um aumento na peroxidação lipídica em bivalves expostos a diferentes tipos de nanopartículas (GOMES et al., 2011, 2012; KÁDÁR et al., 2010), reforçando a ideia de toxicidade e do efeito oxidativo destas substâncias em espécies aquáticas.

A atividade de quatro importantes enzimas antioxidantes também foi analisada na brânquia e na glândula digestiva (Fig. 44). A diminuição da atividade GR foi um efeito marcante, ocorrendo em ambos os tecidos de maneira concomitante ao acúmulo de zinco. A inibição desta enzima por zinco solúvel já foi detectada em diferentes organismos, como mexilhões (FRANCO et al., 2006; TREVISAN et al., 2014), peixes (FRANCO et al., 2008b) e ratos (FRANCO et al., 2008a;

MARIS et al., 2010), sugerindo um papel central desta enzima no mecanismo de toxicidade do zinco. Alterações na atividade GR podem causar um distúrbio na redução da GSSG durante situações de estresse oxidativo, aumentando a susceptibilidade do organismo a danos celulares (conforme investigado no Estudo 2, seção 5.2).

O aumento na atividade GPx detectado na brânquia após 48 h de exposição (Fig. 44) poderia ser uma resposta adaptativa a este cenário de estresse oxidativo moderado. Aumento semelhante já foi indicado na brânquia de *C. gigas* e mexilhões *P. perna* expostos a zinco (CONG et al., 2012; FRANCO et al., 2006; TREVISAN et al., 2014). A regulação do sistema antioxidante pode ser feita pela via do Nrf2, a qual é sensível a agentes oxidantes e eletrofílicos (ITOH et al., 2004). É possível que a condição pró-oxidativa causada pela exposição à ZnONP possa ativar esta via, levando a um aumento na resposta adaptativa da célula. Este mecanismo já foi sugerido por outros trabalhos com nanopartículas em outros modelos animais (KANG et al., 2012; PIRET et al., 2012), porém nenhum estudo foi realizado até então com a via do Nrf2 em bivalves.

Apesar do aumento nos níveis de peroxidação lipídica (Fig. 44), diminuição nos níveis de PSH (Fig. 43) e alteração na atividade da GR e GPx (Fig. 44), não foram observadas alterações em marcadores clássicos de estresse oxidativo, como os níveis de GSSG e a razão GSH/GSSG (Fig. 43), assim como outras enzimas antioxidantes e metabólicas (Cat, TrxR, G6PDH e GAPDH). Além disso, a função e viabilidade celular dos hemócitos também não foram afetadas (dados não apresentados), rejeitando a ideia de um efeito mais geral em diferentes órgãos e tecidos. Estes dados sugerem que, apesar da detecção de efeitos oxidativos (principalmente nas brânquias), a exposição a ZnONP não foi capaz de causar um intenso estresse oxidativo em *C. gigas* usando-se o presente delineamento experimental.

Os dados de proteômica redox com proteínas citosólicas por 2DE SDS-PAGE estão de acordo com esta ideia. Após 48 h de exposição a ZnONP, aproximadamente 4% (de um total de 458 “spots”) das proteínas visualizadas por marcação para tióis com IAF (Fig. 50) e 11% (de um total de 313 “spots”) das proteínas visualizadas por marcação com FTSC para carbonilação (Fig. 51) sofreram alteração significativa em seu perfil de oxidação na brânquia. Quando se analisa os “spots” marcados com Comassie azul coloidal, após 48 h de exposição à ZnONP (Fig. 52), apenas 8% do total de “spots” (726) identificados apresentaram alterações após a exposição a ZnONP. Até o presente momento não há estudos investigando estes mecanismos após exposição

a ZnONP, mesmo em vertebrados, impossibilitando maiores comparações.

A técnica de 2DE SDS-PAGE realizada com o intuito de detectar a oxidação de tióis e carbonilação de proteínas já vem sendo utilizada na área de toxicologia aquática com bivalves. Através desta, por exemplo, foram estudadas proteínas sensíveis a exposição a cádmio, nanopartículas de ouro, quinonas e metabólitos de drogas ilícitas (MCDONAGH; SHEEHAN, 2007; TEDESCO et al., 2010a; PEDRIALI et al., 2012). Além disso, já foram realizados estudos demonstrando que diferentes proteínas podem ser moduladas (aumento ou diminuição na expressão proteica) durante exposição a zinco. No caso da planta *Arabidopsis thaliana*, ocorreu um aumento na expressão de 8 proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico e da vitamina B12 (BARKLA et al., 2014.). Para a planta *Beta vulgaris*, a exposição ao zinco afetou principalmente as proteínas relacionadas ao metabolismo energético aeróbio e ao sistema antioxidante (GUTIERREZ-CARBONELL et al., 2013). Enquanto que em suínos foram observadas alterações no padrão de expressão de proteínas do metabolismo energético, do sistema antioxidante e de biotransformação, de proliferação celular e de apoptose (WANG et al., 2009). Dessa forma, proteínas envolvidas com diferentes vias metabólicas e funções celulares podem ser moduladas durante exposição a zinco. Infelizmente, a identificação das proteínas sensíveis à exposição de ZnONP ainda não foi finalizada, a qual irá auxiliar na caracterização do envolvimento de diferentes vias metabólicas, processos de sinalização e sistemas de defesa celular nos mecanismos de toxicidade nanopartículas em bivalves marinhos.

5.3.4. Alterações mitocondriais causadas por ZnONP

A perda de cristas mitocondriais, assim como outros distúrbios detectados nas mitocôndrias por MET após exposição a ZnONP (Fig. 41 e 42), indicam a participação das nanopartículas no aparecimento do dano mitocondrial (Fig. 56), corroborando com os demais dados obtidos pelos ensaios bioquímicos e proteômicos (Figs. 47 e 48). Danos mitocondriais já foram relacionados com a toxicidade de ZnONP em outros organismos, incluindo a disfunção na atividade mitocondrial, diminuição no potencial de membrana mitocondrial e menor produção de ATP, indução de apoptose e aumento na produção de ERO pela via mitocondrial (GUO et al., 2013; YU et al., 2013; SHARMA et al., 2012). Em mamíferos, cultura de células neurais da retina e em células epiteliais da pele a incorporação de ZnONP causou um aumento na

produção de ERO, levando à disfunção mitocondrial e morte celular (GUO et al., 2013; YU et al., 2013). Em hemócitos da ostra *C. gigas*, foi observado maior taxa de produção de ERO, em paralelo a um decréscimo no número ou massa mitocondrial e do potencial de membrana mitocondrial após exposição *in vitro* a ZnONP (CIACCI et al., 2012).

É possível que a liberação de íons de zinco ao meio de exposição ou no meio intracelular também possa afetar a mitocôndria, aumentando a geração de ERO e causando danos e disfunção mitocondrial. Aparentemente, a mitocôndria de bivalves é sensível à exposição a metais na forma iônica, conforme demonstrado com estudos envolvendo cádmio. O cádmio diminui a taxa de respiração mitocondrial (IVANINA; SOKOLOVA, 2013) e a produção de ATP (KUROCHKIN et al., 2011), assim como a atividade de enzimas do ciclo de Krebs e complexos mitocondriais (IVANINA et al., 2008). A incorporação de nanopartículas também já foi identificada em mitocôndrias de bivalves (KOEHLER et al., 2008), reforçando a hipótese de que estas organelas possam ser importantes alvos da toxicidade de metais solúveis ou nanoparticulados. Além disso, os dados sugerem que a toxicidade de ZnONP pode estar correlacionada com um aumento na produção de ERO e no estresse oxidativo via disfunção mitocondrial em bivalves marinhos (Fig. 56).

6. CONCLUSÕES

No estudo 1, a via de biotransformação de fase II em conjunto com a via do ácido mercaptúrico foi estudada pela primeira vez em bivalves, utilizando o CDNB como composto modelo. Os dados sugerem que esta via de biotransformação faz parte de um importante mecanismo de defesa celular contra agentes eletrofílicos nestes organismos, com a brânquia, glândula digestiva e hemolinfa atuando de maneira integrada (Fig. 53). Estes dados permitiram as seguintes proposições: (i) a brânquia atua como um ponto inicial de conjugação do CDNB com GSH e início do metabolismo de conjugados de glutatona; (ii) a hemolinfa atua como transportador de metabólitos da via do ácido mercaptúrico, especialmente DNP-CYS; (iii) a glândula digestiva atua como um tecido auxiliar nas vias de metabolização do CDNB; (iv) ocorre excreção do metabólito final da via do ácido mercaptúrico, N-acetilcisteína na água do mar. Além disso, os dados sugerem que a brânquia pode ser uma eficiente barreira metabólica em *C. gigas*, merecendo estudos adicionais para confirmar esta função em bivalves marinhos.

No estudo 2, os efeitos inibitórios sobre as enzimas GR e TrxR foram investigados em mexilhões *P. perna* e ostras *C. gigas* utilizando uma exposição aguda a $ZnCl_2$ ou CDNB (Fig. 54 e 55). A menor atividade GR na brânquia de mexilhões, causada pela exposição ao $ZnCl_2$, diminuiu de maneira moderada a capacidade *in vivo* de degradação de peróxidos exógenos, possivelmente por um ineficiente ciclo catalítico da GPx, aumentando a suscetibilidade do organismo a agentes oxidantes. No caso da inibição da GR e TrxR na brânquia por CDNB em ambas as espécies, a degradação de peróxidos *in vivo* é ainda mais perturbada, possivelmente devido a um ineficiente ciclo catalítico da GPx e Prx, também afetados pelo intenso consumo de GSH. Esse cenário aumenta de maneira acentuada a susceptibilidade a agentes oxidantes nas duas espécies.

Por último, o estudo 3 investigou a toxicidade de ZnONP para ostras *C. gigas*, através de análises químicas, bioquímicas e de microscopia eletrônica (Fig. 56). Aparentemente, uma importante via de toxicidade das ZnONP é a liberação de zinco iônico para o meio de exposição, diminuição na atividade da GR e oxidação de proteínas. A mitocôndria se apresentou como uma organela sensível a ZnONP, com perda da estrutura, oxidação de proteínas e alteração na atividade de complexos mitocondriais.

De maneira geral, o papel de proteção celular mediado pelos sistemas de biotransformação e de defesa antioxidante foi investigado em bivalves marinhos em diferentes situações de estresse celular, e está sumarizado na Fig. 57. Danos oxidativos podem ser mediados por diferentes compostos endógenos ou exógenos, neste trabalho representados por quinonas (Men), peróxidos (CHP) e nanopartículas metálicas (ZnONP). Agentes com características eletrofílicas (*e.g.* CDNB) também podem atacar tióis de maneira indiscriminada. Apesar dos danos oxidativos e dos ataques de substâncias eletrofílicas poderem causar distúrbios e eventos de morte celular, as defesas antioxidantes e de biotransformação atuam constantemente prevenindo estes processos, aumentando a sobrevivência celular e do organismo. Neste trabalho, dentre os diferentes elementos dos sistemas antioxidante e de biotransformação, foram estudados os sistemas peroxidáticos da GPx e Prx, assim como a enzima de biotransformação GST e a via do ácido mercaptúrico. Entretanto, quando alguns componentes destes sistemas atuam de maneira ineficiente, conforme apontado pelos estudos com $ZnCl_2$, CDNB e NEM, a célula pode perder a capacidade de regular os níveis de ERO ou de neutralizar agentes eletrofílicos. Nesta situação, a proteção celular está afetada e pode não ser capaz de prevenir os efeitos nocivos de diferentes substâncias, aumentando a possibilidade de que distúrbios celulares levem a eventos de apoptose ou necrose, consequentemente diminuindo a sobrevivência do organismo. Bivalves estão sujeitos à exposição a diferentes tipos de contaminantes ambientais, e dessa forma estudos de seus mecanismos de defesas celulares são fundamentais para a compreensão das respostas destes organismos em ambientes sob pressão antrópica. Espera-se que o desenvolvimento de protocolos para análises de contaminação ambiental possa ser aprimorado a partir desse tipo de informação, integrando eventos bioquímicos e celulares a estudos ecológicos e ambientais.

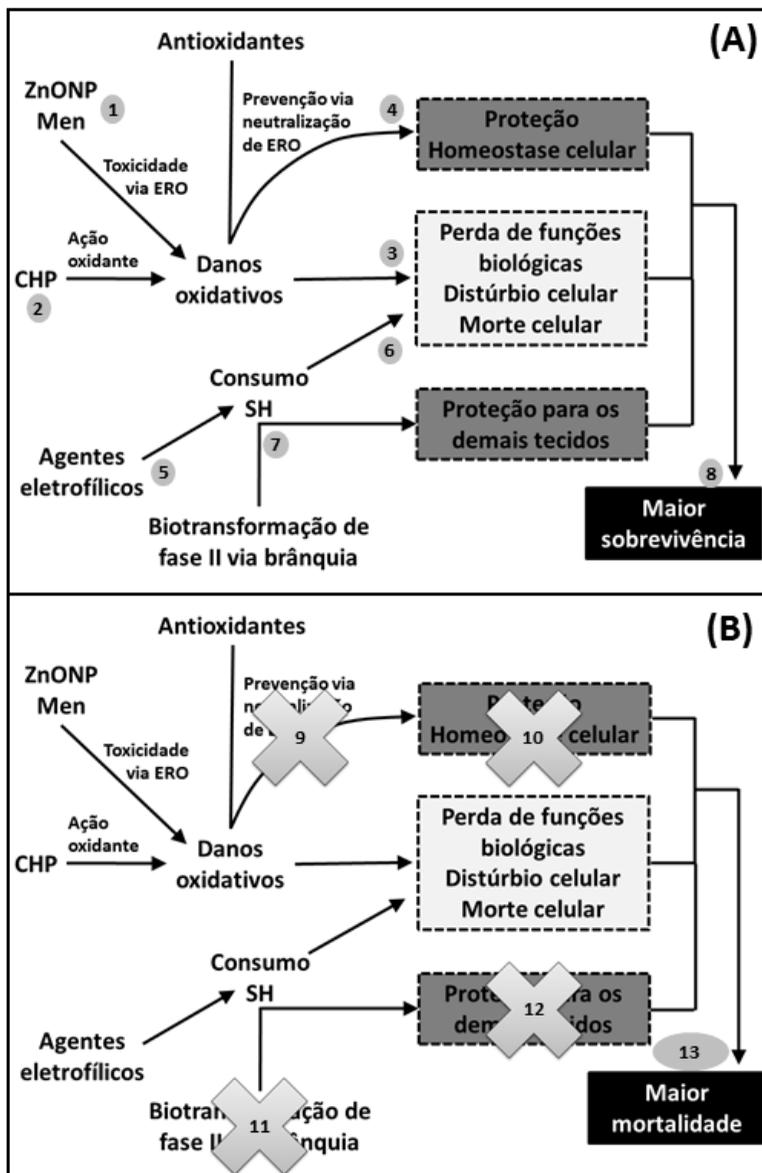


Figura 57: Esquema representando o papel dos sistemas de defesa antioxidante e de biotransformação em bivalves expostos a agentes oxidantes e eletrofilos. (A) Em organismos com ambos os sistemas de defesa operantes, (1) nanopartículas de óxido de zinco (ZnONP) e menadiona (Men) podem causar danos oxidativos através da geração de espécies reativas de

oxigênio (ERO). (2) O hidroperóxido de cumeno (CHP) também pode causar danos oxidativos, devido à sua própria natureza oxidante. (3) Esses danos oxidativos podem causar uma série de distúrbios no organismo. (4) Entretanto, o sistema antioxidante atua a fim de neutralizar o excesso de ERO, prevenindo o acúmulo desses danos e protegendo a célula. (5) Além disso, substâncias com características eletrofílicas podem causar um consumo excessivo de tióis (SH) celulares, (6) também podendo causar disfunções para o organismo. (7) Na brânquia, o sistema de biotransformação de fase II pode realizar a rápida conjugação desses compostos, diminuindo sua toxicidade e prevenindo que estas substâncias alcancem os demais tecidos. (8) Dessa forma, os sistemas de defesas podem atuar garantindo a sobrevivência do organismo mesmo em situações adversas. (B) Entretanto, quando esses sistemas estão ineficientes, (9) a neutralização do excesso de ERO pelos antioxidantes é afetada, (10) diminuindo a capacidade de proteção do organismo. De maneira similar, (11) quando a brânquia não é capaz de realizar a rápida biotransformação de agentes eletrofílicos, (12) estes compostos podem atuar atingindo grupos SH em diferentes tecidos, aumentando suas toxicidades. (13) Assim, a relação entre a defesa celular e a toxicidade das moléculas estudadas é afetada, ocasionando numa maior susceptibilidade e menor sobrevivência do organismo.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. et al. Characterization of brevetoxin metabolism in *Karenia brevis* bloom-exposed clams (*Mercenaria sp.*) by LC-MS/MS. **Toxicol.**, v. 60, n. 6, p. 1030–1040, 2012.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMAD, I. et al. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury — Organ specificities and age effect. **Aquatic Toxicology**, v. 103, n. 3–4, p. 150–158, 2011.
- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 373–382, 1981.
- AL-SUBIAI, S. N. et al. Merging nano-genotoxicology with ecogenotoxicology: an integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C(60) fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus sp.* **Mutation Research**, v. 745, n. 1-2, p. 92–103, 2012.
- ALI, D. et al. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. **Aquatic Toxicology**, v. 124-125, p. 83–90, 2012.
- ALMEIDA, D. V. et al. Induction of phase II enzymes and hsp70 genes by copper sulfate through the electrophile-responsive element (EpRE): insights obtained from a transgenic zebrafish model carrying an orthologous EpRE sequence of mammalian origin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 347–353, 2010.
- ANGUIANO, G. A. et al. Effects of exposure to oxamyl, carbofuran, dichlorvos, and lindane on acetylcholinesterase activity in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 327–332, 2010.
- ANTOGNELLI, C. et al. Activity changes of glyoxalase system enzymes and glutathione-S-transferase in the bivalve mollusc *Scapharca inaequivalvis* exposed to the organophosphate chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 2, p. 72–77, 2006.
- APETI, D. A. et al. A historical assessment of coastal contamination in Birch Harbor, Maine based on the analysis of mussels collected in the 1940s and the Mussel Watch Program. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 5, p. 732–742, 2010.
- ARNÉR, E. S. J.; BJÖRNSTEDT, M.; HOLMGREN, A. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene Is an Irreversible Inhibitor of Human Thioredoxin

Reductase: Loss of Thioredoxin Disulfide Reductase Activity is Accompanied by a Large Increase in NADPH Oxidase Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3479–3482, 1995.

ARNÉR, E. S.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 300, p. 226–239, 1999.

ATES, M. et al. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 1, p. 225–233, 2012.

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L. A.; MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p. 106–114, 2005.

BARATA, C. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 175–186, 2005.

BARKLA, B. J. et al. Quantitative proteomics of heavy metal exposure in *Arabidopsis thaliana* reveals alterations in one-carbon metabolism enzymes upon exposure to zinc. **Journal of Proteomics**, 2014. In print.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914001286>

>. Acessado em: 21 maio 2014.

BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26012, 2011.

BAUN, A. et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 387–395, 2008.

BEBIANNI, M. J. et al. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. **Biomarkers**, v. 9, n. 4-5, p. 305–330, 2004.

BENHAR, M.; FORRESTER, M.T.; STAMLER, J.S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nature Reviews in Molecular and Cell Biology** v.10, p.721–732, 2009.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. H1227–H1236, 2007.

- BESSEMS, J. G. M.; VERMEULEN, N. P. E. Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 31, p. 55-138, 2001.
- BILZER, M. et al. Interaction of a glutathione S-conjugate with glutathione reductase Kinetic and X-ray crystallographic studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 138, n. 2, p. 373-378, 1984.
- BISHOP, G. M.; DRINGEN, R.; ROBINSON, S. R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1222-1230, 2007.
- BITEAU, B.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. **Nature**, v. 425, n. 6961, p. 980-984, 2003.
- BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. 2. ed. Londres: Taylor & Francis, 2007. 416 p.
- BOLTON, J. L. et al. Role of Quinones in Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 135-160, 2000.
- BOSSY-WETZEL, E. et al. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. **Neuron**, v. 41, n. 3, p. 351-365, 2004.
- BOUILLY, K. et al. Impact of Diuron on Aneuploidy and Hemocyte Parameters in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 58-63, 2007.
- BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 32, p. 173-219, 1969.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGADIN, M. et al. Effect of Metal Complexes on Thioredoxin Reductase and the Regulation of Mitochondrial Permeability Conditions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1030, n. 1, p. 348-354, 2004.
- BRANDES, N. et al. Using Quantitative Redox Proteomics to Dissect the Yeast Redoxome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 48, p. 41893-41903, 2011.

- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; FLOHÉ, L. Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 8, p. 2335–2381, 2011.
- BRUNNER, T. J. et al. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4374–4381, 2006.
- BUFFET, P.-E. et al. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 166–174, 2011.
- BUFFET, P.-E. et al. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 191–198, 012.
- BURMESTER, V.; NIMPTSCH, J.; WIEGAND, C. Adaptation of freshwater mussels to cyanobacterial toxins: Response of the biotransformation and antioxidant enzymes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 296–309, 2012.
- CAJARAVILLE, M. P.; OLABARRIETA, I.; MARIGOMEZ, I. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, n. 3, p. 253–260, 1996.
- CANESI, L. et al. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. **Environment International**, v. 34, n. 8, p. 1114–1119, 2008.
- CANESI, L. et al. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 151–158, 2010.
- CANESI, L. et al. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. **Marine Environmental Research**, v. 76, p. 16–21, 2012.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.
- CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309–316, 1996.
- CHÂTEL, A. et al. Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo[a]pyrene. **Mutagenesis**, v. 27, n. 6, p. 703–711, 2012.

- CHATZIARGYRIOU, V.; DAILIANIS, S. The role of selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) against oxidative and genotoxic effects of mercury in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1363–1372, 2010.
- CHEN, J.; XIE, P. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 572–584, 2005.
- CHEUNG, C. C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3–4, p. 189–203, 2001.
- CHEUNG, C. C. C. et al. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Environmental Pollution**, v. 128, n. 3, p. 393–403, 2004.
- CHEVALLET, M. et al. Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxin can be reduced during recovery after oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37146–37153, 2003.
- CHOI, N. M. C. et al. Relationships between tissue concentrations of paralytic shellfish toxins and antioxidative responses of clams, *Ruditapes philippinarum*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 5, p. 572–578, 2006.
- CHOONG, G. et al. Cadmium-induced glutathionylation of actin occurs through a ROS-independent mechanism: Implications for cytoskeletal integrity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, p. 423–430, 2013.
- CHORA, S. et al. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 300–308, 2009.
- CHOUCHANI, E. T. et al. Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 120–128, 2011.
- CIACCI, C. et al. Immunomodulation by Different Types of N-Oxides in the Hemocytes of the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36937, maio 2012.
- COMISSÃO EUROPÉIA, IP/11/1202 18/10/2011 2011. Disponível em <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index.htm>. Acessado dia 30/07/2014.

- CONG, M. et al. Effects of heavy metals on the expression of a zinc-inducible metallothionein-III gene and antioxidant enzyme activities in *Crassostrea gigas*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1928–1936, 2012.
- CONTARDO-JARA, V.; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. **Toxicol**, v. 52, n. 8, p. 936–943, 2008.
- COULEAU, N. et al. Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: Preliminary investigations. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 490–497, 2012.
- COSSU, C. et al. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 2, p. 106–121, 2000.
- DAFRE, A. L. et al. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, n. 2–3, p. 97–105, 2004.
- DAILIANIS, S.; PATETSINI, E.; KALOYIANNI, M. The role of signalling molecules on actin glutathionylation and protein carbonylation induced by cadmium in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 22, p. 3612–3620, 2009.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, 2003.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine** v.9, p.169–176, 2005.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 2, p. 85–96, 2009.
- DAMÁSIO, J. et al. Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1084–1094, 2010.
- DAVID, E.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Peroxiredoxin 6 gene: A new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 3, p. 389–398, 2007.
- DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1703, n. 2, p. 93–109, 2005.

- DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 161–172, 1994.
- DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5–6, p. 1019–1026, 2002.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T. et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11908–11913, 2002.
- DOWNS, C. A. et al. Cellular physiological assessment of bivalves after chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil using a novel molecular diagnostic biotechnology. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 13, p. 2987–2993, 2002.
- DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biological Chemistry**, v. 384, p. 505–516, 2003.
- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.
- ELLISON, I.; RICHIE JR., J. P. Mechanisms of glutathione disulfide efflux from erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 164–169, 2012.
- ERICKSON, R. J.; MCKIM, J. M. A model for exchange of organic chemicals at fish gills: flow and diffusion limitations. **Aquatic Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 175–197, 1990.
- FERNANDES, S.; WELKER, M.; VASCONCELOS, V. M. Changes in the GST activity of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during exposure and depuration of microcystins. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 311A, n. 3, p. 226–230, 2009.
- FERNÁNDEZ, B. et al. Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte (Galicia, NW Spain) by means of mussel chemical, biochemical and physiological parameters. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 4, p. 735–750, 2010.
- FLOHE, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 132–134, maio 1973.
- FRANCO, J. L. et al. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 3, p. 232–240, 2006.
- FRANCO, J. L. et al. Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect

of zinc in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 2, p. 316–323, 2008a.

FRANCO, J. L. et al. Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: Glutathione reductase as a target. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 88–89, 2008b.

FRENZILLI, G. et al. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2–5, p. 609–613, 2004.

FUNES, V. et al. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 2, p. 214–223, 2006.

GAGNAIRE, B. et al. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2006.

GAGNAIRE, B. et al. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 92–102, 2007.

GAGNÉ, F. et al. The effects of zinc oxide nanoparticles on the metallome in freshwater mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 158, n. 1, p. 22–28, 2013.

GALLOWAY, T. S.; DEPLEDGE, M. H. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. **Ecotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 5–23, 2001.

GAMBLE, S. C.; WISEMAN, A.; GOLDFARB, P. S. Selenium-dependent glutathione peroxidase and other selenoproteins: their synthesis and biochemical roles. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 123–134, 1997.

GARCÍA-LAGUNAS, N.; ROMERO-GERALDO, R.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y. Genomics study of the exposure effect of *Gymnodinium catenatum*, a garalyzing toxin producer, on *Crassostrea gigas*' defense system and detoxification genes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72323, 2013.

GARCÍA-NEGRETE, C. A. et al. Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 134–141, 2013.

GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 42–46, 2002.

- GAZARYAN, I. G. et al. Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24373–24380, 2007.
- GENARD, B. et al. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64534, 2013.
- GÉRET, F. et al. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). **Aquatic Living Resources**, v. 15, n. 1, p. 61–66, 2002.
- GHEZZI, P. Protein glutathionylation in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1830, p. 3165-3172, 2013.
- GHERSI-EGEA, J.-F. et al. Brain protection at the blood–cerebrospinal fluid interface involves a glutathione-dependent metabolic barrier mechanism. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, n. 9, p. 1165–1175, 2006.
- GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 8, p. 1529–1542, 1998.
- GIULIANI, M. E.; REGOLI, F. Identification of the Nrf2–Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: Role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 117–123, 2014.
- GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 400–408, 1953.
- GO, Y.-M.; JONES, D. P. The redox proteome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26512–26520, 2013.
- GOMES, T. et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 21, p. 9356–9362, 2011.
- GOMES, T. et al. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 118–119, p. 72–79, 2012.
- GONG, X. et al. Application of SSH and quantitative real time PCR to construction of gene expression profiles from scallop *Chlamys farreri* in response to exposure to tetrabromobisphenol A. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 911–918, 2012.

- GONZALEZ, M. et al. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 2, p. 1089–1097, 2005.
- GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M. J. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 361–371, 2012.
- GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M. J. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Pollution**, v. 173, p. 200–209, 2013.
- GOSLING, E. **Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture**. 1. ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2003. 456 p.
- GOWD, S. S.; GOVIL, P. K. Distribution of heavy metals in surface water of Ranipet industrial area in Tamil Nadu, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 136, n. 1-3, p. 197–207, 2008.
- GRAVATO, C.; OLIVEIRA, M.; SANTOS, M. A. Genotoxic effects and oxidative stress responses induced by retene in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 13, p. 795–800, 2004.
- GREEN, T. J.; BARNES, A. C. Inhibitor of REL/NF-KB is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 260–265, 2009.
- GREK, C. L. et al. Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26497–26504, 2013.
- GRIFFITT, R. J. et al. Cathepsin B and glutathione peroxidase show differing transcriptional responses in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio* following exposure to three xenobiotics. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 11, p. 3640–3645, 2006.
- GUO, D. et al. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 731–738, 2013.
- GUPTA, S. K.; SINGH, J. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. **IIOAB Journal**, v. 2, n. 1, p. 49–57, 2011.
- GUST, M. et al. In vitro immunotoxicity of environmentally representative antibiotics to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. **Environmental Pollution**, v. 169, p. 50–58, 2012.

- GUTIERREZ-CARBONELL, E. et al. Changes induced by zinc toxicity in the 2-DE protein profile of sugar beet roots. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 149–161, 2013.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398–405, 1981.
- HAJ-YEHIA, A. I.; BENET, L. Z. In vivo depletion of free thiols does not account for nitroglycerin-induced tolerance: a thiol-nitrate interaction hypothesis as an alternative explanation for nitroglycerin activity and tolerance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 3, p. 1296–1305, 1996.
- HALDEN, R. U. Introduction to Contaminants of Emerging Concern in the Environment: Ecological and Human Health Considerations. In: **Contaminants of Emerging Concern in the Environment: Ecological and Human Health Considerations**. ACS Symposium Series. [s.l.] American Chemical Society, 2010. v. 1048 p. 1–6.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 851 p.
- HAN, D. et al. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 1136–1144, 2003.
- HANNA, S. K. et al. Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the individual performance of *Mytilus galloprovincialis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61800, 2013.
- HANNAM, M. L. et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 779–784, 2010.
- HAO, L.; CHEN, L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 103–110, 2012.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, 2005.
- HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 31, n. 4, p. 273–300, 1999.
- HAYTON, W. L.; BARRON, M. G. Rate-limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 151–157, 1990.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; 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. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, n. 2, p. 249–265, 2003.

HEISS, E.; GERHÄUSER, C. Time-dependent modulation of thioredoxin reductase activity might contribute to sulforaphane-mediated inhibition of NF- κ B binding to DNA. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 11-12, p. 1601–1611, 2005.

HINCHMAN, C. A. et al. Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 33, p. 22179–22185, 1991.

HINCHMAN, C. A.; BALLATORI, N. Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 41, n. 4, p. 387–409, 1994.

HYLLAND, K. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 69, n. 1-2, p. 109–123, 2006.

INOUE, M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 23, p. 2495–2505, 2003.

IONESCU, C.; CAIRA, M. R. (Eds.). **Drug Metabolism: Current Aspects**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2005. 420 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 851 p.

IONNIDES, C. **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. 588 p.

ITOH, K.; TONG, K. I.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 10, p. 1208–1213, 2004.

IVANINA, A. V.; HABINCK, E.; SOKOLOVA, I. M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 1, p. 72–79, 2008.

IVANINA, A. V.; SOKOLOVA, I. M. Interactive effects of pH and metals on mitochondrial functions of intertidal bivalves *Crassostrea*

- virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **Aquatic Toxicology**, v. 144–145, p. 303–309, 2013.
- IZQUIERDO-ÁLVAREZ, A.; MARTÍNEZ-RUIZ, A. Thiol redox proteomics seen with fluorescent eyes: The detection of cysteine oxidative modifications by fluorescence derivatization and 2-DE. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 329–338, 2011.
- JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 12, p. 1499–1506, 2003.
- JOCELYN, P. C. Spectrophotometric assay of thiols. **Methods in Enzymology**, v. 143, p. 44–67, 1987.
- JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, n. 4, p. C849–C868, 2008.
- JOUBERT, Y. et al. Subcellular localization of gold nanoparticles in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana* after exposure through the water. **Gold Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 47–56, 2013.
- KÁDÁR, E. et al. Uptake and biological responses to nano-Fe versus soluble FeCl₃ in excised mussel gills. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 657–666, 2010.
- KANG, S. J. et al. Role of the Nrf2-heme oxygenase-1 pathway in silver nanoparticle-mediated cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 1, p. 89–98, 2012.
- KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1304–1309, 2009.
- KEHRER, J. P.; LUND, L. G. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 1, p. 65–75, 1994.
- KILEY, P. J.; STORZ, G. Exploiting thiol modifications. **PLoS Biology**, v. 2, n. 11, p. e400, 2004.
- KOEHLER, A. et al. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas - a new threat to marine life? **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 12–14, 2008.
- KOUKOUZIKA, N.; DIMITRIADIS, V. K. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: “lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress”. **Ecotoxicology**, v. 14, n. 4, p. 449–463, 2005.

- KRANCE, S. M. et al. Transient glutathione depletion determines terminal differentiation in HL-60 cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 53–60, 2010.
- KUCHEL, R. P.; NAIR, S.; RAFTOS, D. A. Changes in the transcriptional expression of oxidative stress response genes in Akoya pearl oysters (*Pinctada fucata*) exposed to air and mechanical agitation. **Aquaculture**, 362–363, p. 33–38, 2012.
- KUMAR, A. et al. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 10, p. 1872–1881, 2011.
- KUROCHKIN, I. O. et al. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 1, p. R21–R31, 2011.
- ŁABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives. **Mutation Research**, v. 603, n. 1, p. 48–55, 2006.
- LAU, P. S.; WONG, H. L. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 12, p. 1563–1572, 2003.
- LAWRENCE, R. A.; BURK, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 71, n. 4, p. 952–958, 1976.
- LEICHERT, L. I. et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8197–8202, 2008.
- LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1921–1942, 2004.
- LIVINGSTONE, D. R. et al. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. **Marine Biology**, v. 112, n. 2, p. 265–276, 1992.
- LIVINGSTONE, D. R.; GARCIA MARTINEZ, P.; WINSTON, G. W. Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland musomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 213–236, 1989.

- LUCH, A. (Ed.) **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**. 2. ed. Berlin: Birkhäuser Verlag AG, 2009. v. 1: Molecular Toxicology. 484 p.
- LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 652–660, 2011.
- LÜCHMANN, K. H. et al. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, 2014. In print. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X14001507>>
. Acessado em 21 de maio de 2014.
- LUCKENBACH, T.; ALTENBURGER, R.; EPEL, D. Teasing apart activities of different types of ABC efflux pumps in bivalve gills using the concepts of independent action and concentration addition. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 75–76, 2008.
- LUCKENBACH, T.; EPEL, D. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 6, p. R1919–R1929, 2008.
- MA, H.; WILLIAMS, P. L.; DIAMOND, S. A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 76–85, 2013.
- MANZETTI, S. Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines, and nitroarenes through molecular properties. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 349–361, 2012.
- MARIA, V. L.; SANTOS, M. A.; BEBIANNO, M. J. Biomarkers of damage and protection in *Mytilus galloprovincialis* cross transplanted in Ria Formosa Lagoon (Portugal). **Ecotoxicology**, v. 18, n. 8, p. 1018–1028, 2009.
- MARIS, A. F. et al. Gender effects of acute malathion or zinc exposure on the antioxidant response of rat hippocampus and cerebral cortex. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 965–970, 2010.
- MASTERS, B. S. S. et al. Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 2, p. 921–931, 1965.
- MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 2000.

MCDONAGH, B.; SHEEHAN, D. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: Carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 325–333, 2006.

MCDONAGH, B.; SHEEHAN, D. Effect of oxidative stress on protein thiols in the blue mussel *Mytilus edulis*: Proteomic identification of target proteins. **Proteomics**, v. 7, n. 18, p. 3395–3403, 2007.

MCDONAGH, B.; SHEEHAN, D. Effects of oxidative stress on protein thiols and disulphides in *Mytilus edulis* revealed by proteomics: Actin and protein disulphide isomerase are redox targets. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 193–195, 2008.

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 3, p. 315–326, 2005.

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Redox proteomics in the mussel, *Mytilus edulis*. **Marine Environmental Research**, v. 62, Supplement 1, p. S101–S104, 2006.

MELLO, D. F. et al. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, n. 3, p. 583–597, 2012.

MELLO, D. F. et al. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. **Harmful Algae**, v. 26, p. 45–51, 2013.

MEYER, Y.; BUCHANAN, B.B.; VIGNOLS, F.; REICHHELD, J.P. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. **Annual Reviews in Genetics** v.43, p.335–367, 2009.

MICHELIS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235–248, 1994.

MITOZO, P. A. et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 69–77, 2011.

MIZE, C. E.; LANGDON, R. G. Hepatic glutathione reductase I. Purification and general kinetic properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 5, p. 1589–1595, 1962.

MONKS, T. J. et al. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 112, n. 1, p. 2–16, 1992.

- MONTES, M. O. et al. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. **Journal of Hazardous Materials**, v. 225–226, p. 139–145, 2012.
- MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, n. 8, p. 967–976, 2006.
- MORRÉ, D. J.; MORRÉ, D. M. Differential response of the NADH oxidase of plasma membranes of rat liver and hepatoma and HeLa cells to thiol reagents. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 27, n. 1, p. 137–144, 1995.
- MUELLER, S.; RIEDEL, H.-D.; STREMMEL, W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4973–4978, 1997.
- MURPHY, M. E.; SCHOLICH, H.; SIES, H. Protection by glutathione and other thiol compounds against the loss of protein thiols and tocopherol homologs during microsomal lipid peroxidation. **European Journal of Biochemistry**, v. 210, n. 1, p. 139–146, 1992.
- MYDLARZ, L. D.; JONES, L. E.; HARVELL, C. D. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, n. 1, p. 251–288, 2006.
- NAMIESNIK, J. et al. Concentration of bioactive compounds in mussels *Mytilus galloprovincialis* as an indicator of pollution. **Chemosphere**, v. 73, n. 6, p. 938–944, 2008.
- NAVARRO, A. et al. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. **Aquatic Toxicology**, v. 122–123, p. 144–152, 2012.
- NEFF, J. M. (Ed.) **Bioaccumulation in Marine Organisms**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2002. p. 241–318. 452 p.
- NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.
- NYSTROM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **EMBO Journal**, v. 24, p.1311–1317, 2005.
- OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447–463, 2003.

- O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, p. 1-41, 1991.
- OSMAN, A. M. et al. In vivo exposure of *Dreissena polymorpha* mussels to the quinones menadione and lawsone: menadione is more toxic to mussels than lawsone. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2004.
- PAIN, S.; PARANT, M. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1258-1263, 2007.
- PAN, J.-F. et al. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 37-43, 2012.
- PARK, H. et al. Analysis of ESTs and expression of two peroxiredoxins in the thermally stressed Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 5, p. 550-559, 2008.
- PEAKALL, D. B. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1, n. 2, p. 55-60, 1994.
- PEDRIALI, A. et al. A redox proteomic investigation of oxidative stress caused by benzoylecgonine in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 8, p. 646-656, 2013.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M. D.; PEÑA, J. B. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. **Chemosphere**, v. 47, n. 5, p. 485-497, 2002.
- PESKIN, A. V. et al. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11885-11892, 2007.
- PETERSEN, D. R.; DOORN, J. A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 7, p. 937-945, 2004.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- PIPE, R.K. et al. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v.46, p.43-54, 1999.
- PIRET, J.-P. et al. Copper(II) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response. **Nanoscale**, v. 4, n. 22, p. 7168-7184, 2012.

- POOLE, L. B.; HALL, A.; NELSON, K. J. Overview of Peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. **Current Protocols in Toxicology**, v.49, p. 7.9.1-7.9.15, 2011.
- POURAHMAD, J. et al. A search for hepatoprotective activity of aqueous extract of *Rhus coriaria* L. against oxidative stress cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 854–858, 2010.
- REBBEOR, J. F. et al. Glutathione S-conjugate formation and metabolism in HepG2 cells: a cell model of mercapturic acid biosynthesis. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 53, n. 8, p. 651–663, 1998.
- REDDAN, J. R. et al. Protection from oxidative insult in glutathione depleted lens epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 68, n. 1, p. 117–127, 1999.
- REGOLI, F. et al. Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1–2, p. 13–25, 2000.
- REGOLI, F. et al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 419–423, 2002.
- REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 143–164, 1995.
- REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1–2, p. 22–53, 2007.
- REN, X. et al. Cloning and expression of a single-chain catalytic antibody that acts as a glutathione peroxidase mimic with high catalytic efficiency. **Biochemical Journal**, v. 359, p. 369–374, 2001.
- RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4403–4410, 2012.
- RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1543–1552, 2005.
- RIDGWAY, I. et al. Resistance to oxidative stress is not associated with the exceptional longevity of the freshwater pearl mussel, *Margaritifera*

margaritifera nor three unionid species. **Aquatic Sciences**, v. 76, n. 2, p. 259–267, 2014.

RINGWOOD, A. H. et al. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. **Marine Environmental Research**, v. 69, Supplement 1, p. S49–S51, 2010.

ROCHER, B. et al. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 1, p. 65–77, 2006.

ROSSI, R. et al. Different metabolizing ability of thiol reactants in human and rat blood: biochemical and pharmacological implications. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7004–7010, 2001.

SABATINI, S. E. et al. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis* patagonicus upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1188–1194, 2011a.

SABATINI, S. E. et al. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 391–398, 2011b.

SACCHETTA, P.; DI COLA, D.; FEDERICI, G. Alkaline hydrolysis of N-ethylmaleimide allows a rapid assay of glutathione disulfide in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 154, n. 1, p. 205–208, 1986.

SAKAI, J. et al. Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. **Immunity**, v. 37, p. 1037–1049, 2012.

SCHMIDT, E. C. et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 860–869, 2009.

SCHRÖDER, P. et al. How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). **Environmental Science and Pollution Research - International**, v. 14, n. 2, p. 114–122, 2007.

SEYFRIED, J.; WÜLLNER, U. Inhibition of Thioredoxin reductase induces apoptosis in neuronal cell lines: Role of glutathione and the MKK4/JNK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, n. 3, p. 759–764, 2007.

SHARMA, V. et al. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide

- nanoparticles. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1–2, p. 84–91, 2012.
- SHEEHAN, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 123, n. 3, p. 193–199, 1999.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.
- SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signalling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc.R113.544635, 2014.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- STANLEY, B. A. et al. Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H₂O₂ emission from isolated heart mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 38, p. 33669–33677, 2011.
- STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 90, p. 101–109, 1991.
- STOELTING, M. S.; TJEERDEMA, R. S. Glutathione-dependent biotransformation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in arterial and venous blood of the striped bass (*Morone saxatilis*). **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 177–187, 2000.
- STORRIE, B.; MADDEN, E. A. Isolation of subcellular organelles. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 203–225, 1990.
- SUKHOTIN, A. A.; ABELE, D.; PRITNER, H. O. Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 226, p. 223–234, 2002.
- SUREDA, A. et al. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 3–4, p. 540–549, 2011.
- TEDESCO, S. et al. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 2, p. 167–174, 2010a.
- TEDESCO, S. et al. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 178–186, 2010b.

- TERLOUW, S. A. et al. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in glutathione-bimane efflux from Caco-2 and rat renal proximal tubule cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 5, p. 931–938, 2001.
- THOMAS, J. A.; POLAND, B.; HONZATKO, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 319, n. 1, p. 1–9, 1995.
- TOPPO, S. et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** v. 1790, n. 11, p. 1486–1500, 2009.
- TORRES, M. A. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 1–15, 2008.
- TRACHOOTHAM, D. et al. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343–1374, 2008.
- TRAN, D. et al. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2007.
- TREVISAN, R. et al. Selenium in water enhances antioxidant defenses and protects against copper-induced DNA damage in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 64–71, 2011.
- TREVISAN, R. et al. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 159, p. 22–30, 2014.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151–173, 1977.
- TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- TSANGARIS, C. et al. Assessment of contaminant impacts in a semi-enclosed estuary (Amvrakikos Gulf, NW Greece): Bioenergetics and biochemical biomarkers in mussels. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 161, n. 1-4, p. 259–269, 2010.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.
- ULRICH, P. N.; MARSH, A. G. Thermal sensitivity of mitochondrial respiration efficiency and protein phosphorylation in the clam *Mercenaria mercenaria*. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 608–618, 2009.

- UNGVARI, Z. et al. Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 66A, n. 7, p. 741–750, 2011.
- UNGVARI, Z. et al. Testing predictions of the oxidative stress hypothesis of aging using a novel invertebrate model of longevity: the giant clam (*Tridacna Derasa*). **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 4, p. 359–367, 2013a.
- UNGVARI, Z. et al. Resistance to genotoxic stresses in *Arctica islandica*, the longest living noncolonial animal: is extreme longevity associated with a multistress resistance phenotype? **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 5, p. 521–529, 2013b.
- URŠIČ, D. et al. Influence of luminal monosaccharides on secretion of glutathione conjugates from rat small intestine in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 2, p. 199–204, 2009.
- VAIDYA, S. S.; GERK, P. M. Simultaneous determination of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione and its metabolites for human placental disposition studies by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n. 1, p. 94–102, 2007.
- VAIDYA, S. S.; W. WALSH, S.; M. GERK, P. Application of human placental villous tissue explants to study ABC transporter mediated efflux of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 814–823, 2011.
- VASCONCELOS, V. M.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. **Toxicol**, v. 50, n. 6, p. 740–745, 2007.
- VASSEUR, P.; LEGUILLE, C. Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 433–436, 2004.
- VERLECAR, X. N.; JENA, K. B.; CHAINY, G. B. N. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, n. 3, p. 219–226, 2007.
- VILLANUEVA, S. S. M. et al. Involvement of Mrp2 in hepatic and intestinal disposition of dinitrophenyl-S-glutathione in partially hepatectomized rats. **Toxicological Sciences**, v. 84, n. 1, p. 4–11, 2005.

- VILLANUEVA, S. S. M. et al. Hepatic and extrahepatic synthesis and disposition of dinitrophenyl-S-glutathione in bile duct-ligated rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 8, p. 1301–1309, 2006.
- VIMARD, F. et al. Toxicity induced by cumene hydroperoxide in PC12 cells: protective role of thiol donors. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 205–215, 2011.
- VLAHOGIANNI, T. et al. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 9, p. 1361–1371, 2007.
- VOETS, J. et al. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. **Aquatic Toxicology**, v. 93, n. 1, p. 53–60, 2009.
- WALTHER, U. I. et al. Zinc toxicity in various lung cell lines is mediated by glutathione and GSSG reductase activity. **Biological Trace Element Research**, v. 78, n. 1-3, p. 163–178, 2000.
- WANG, H. et al. Proteomic analysis of early-responsive redox-sensitive proteins in Arabidopsis. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 1, p. 412–424, 2012a.
- WANG, W.-X. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. **Chinese Science Bulletin**, v. 58, n. 2, p. 194–202, 2013.
- WANG, X. et al. Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small intestine of zinc oxide-supplemented piglets. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 209–218, 2009.
- WANG, Z. et al. LC/MS analysis of brevetoxin metabolites in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Toxicon**, v. 43, n. 4, p. 455–465, 2004.
- WANG, Z. et al. Incorporation of in situ exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 90–98, 2012b.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.
- WHALEN, K. E. et al. The role of multixenobiotic transporters in predatory marine molluscs as counter-defense mechanisms against dietary allelochemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 288–300, 2010.

- WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 137–161, 1991.
- WINTERBOURN, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. **Methods in Enzymology**. v. 528p. p. 3–25.
- WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549–561, 2008.
- WONG, C. M. et al. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. **Circulatory Research** v.102, p.310–318, 2008.
- WONG, C. M. et al. Proposed role of primary protein carbonylation in cell signalling. **Redox Report**, v.17, p.90-94, 2012.
- WONG, S. W. Y. et al. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 609–618, 2010.
- XIA, T. et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. **ACS Nano**, v. 2, n. 10, p. 2121–2134, 2008.
- YAN, G. et al. Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 47, n. 4, p. 577–588, 2012.
- YANG, K.-S. et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38029–38036, 2002.
- YU, K.-N. et al. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 4, p. 1187–1195, 2013.
- YU, L. et al. Comparative toxicity of nano-ZnO and bulk ZnO suspensions to zebrafish and the effects of sedimentation, $\cdot\text{OH}$ production and particle dissolution in distilled water. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1975–1982, 2011.
- ZABLOTOWICZ, R. M. et al. Glutathione-s-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1054–1060, 1995.
- ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 72, n. 1, p. 19–66, 1999.
- ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic

sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196–198, 2008.

ZHANG, H. et al. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. **ACS Nano**, v. 6, n. 5, p. 4349–4368, 2012.

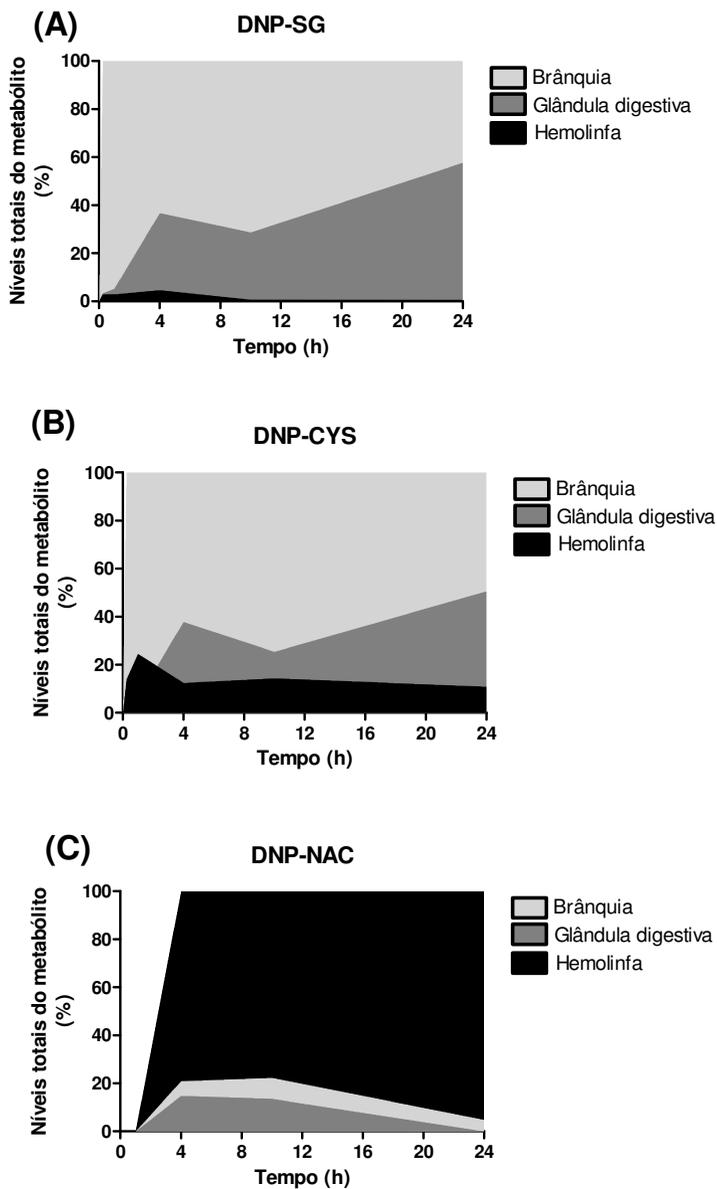
ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9382–9385, 1992.

ZHANG, K.; WONG, K. P. Active transport of glutathione S-conjugate in human colon adenocarcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 108, n. 1, p. 143–151, 1996.

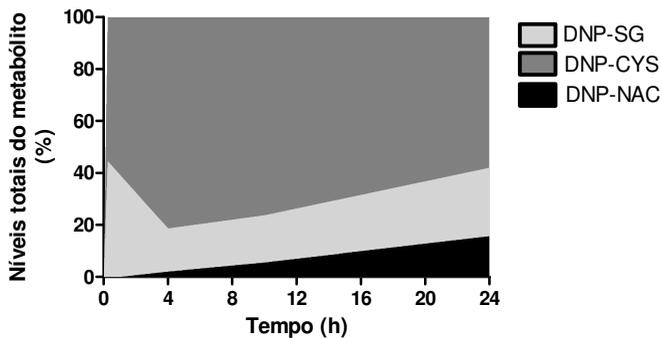
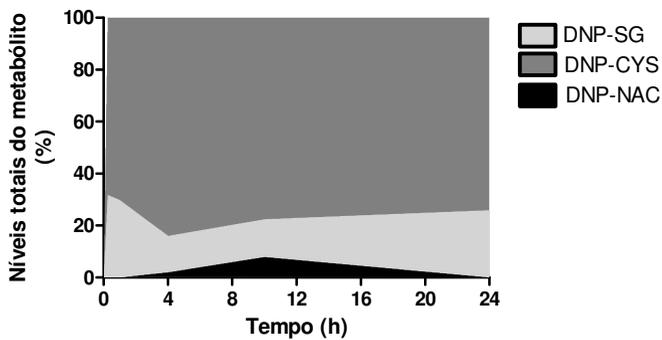
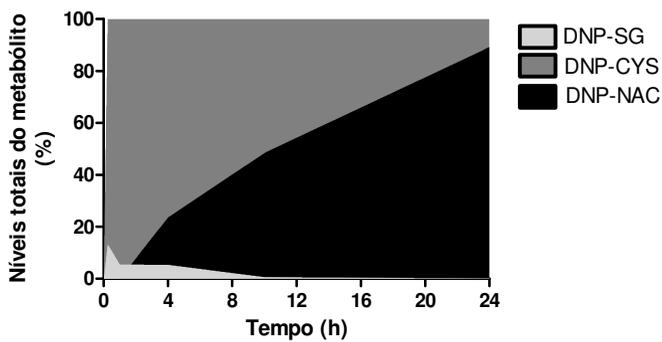
ZUYKOV, M. et al. Alteration of shell nacre micromorphology in blue mussel *Mytilus edulis* after exposure to free-ionic silver and silver nanoparticles. **Chemosphere**, v. 84, n. 5, p. 701–706, 2011.

ZUYKOV, M.; PELLETIER, E.; HARPER, D. A. T. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 201–208, 2013.

ANEXOS



Anexo 1: Representação da distribuição de cada metabólito entre os diferentes tecidos analisados em ostras *Crassostrea gigas* expostas a CDNB 10 μM por 24 h. Níveis relativos de (A) dinitrofenil-glutationa (DNP-SG), (B) dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) e (C) dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC). Para cada tempo, foi realizada a soma dos níveis de cada metabólito presentes na brânquia, glândula digestiva e hemolinfa. O valor obtido foi então utilizado para normalizar, os níveis de cada metabólito nos diferentes tecidos, refletindo a distribuição relativa de DNP-SG, DNP-CYS ou DNP-NAC entre os tecidos ao longo do tempo.

Brânquia**Glândula digestiva****Hemolinfa**

Anexo 2: Representação da distribuição dos diferentes metabólitos analisados em cada tecido de ostras *Crassostrea gigas* expostas a CDNB 10 μM por 24 h. Níveis relativos de dinitrofenil-glutationa (DNP-SG), dinitrofenil-cisteína (DNP-CYS) e dinitrofenil-N-acetilcisteína (DNP-NAC) na (A) brânquia, (B) glândula digestiva e (C) hemolinfa. Para cada tempo, foi realizada a soma dos níveis de todos metabólitos presentes em cada tecido. O valor obtido foi então utilizado para normalizar os níveis dos metabólitos em cada tecido, refletindo a distribuição relativa de DNP-SG, DNP-CYS ou DNP-NAC para cada tecido ao longo do tempo.