



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**HISTOPATOLOGIA E HIBRIZAÇÃO *IN SITU* DE
CITOCROMO P450 (*CYP2A1*) EM ÓSTRAS *Crassostrea*
brasiliensis EXPOSTAS AO FENANTRENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. Afonso Celso Dias Bainy
Coorientador: Dr. Eduardo Cargnin Ferreira

ISIS MAYNA MARTINS DOS REIS

FLORIANÓPOLIS
2014

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

Reis, Isis Mayna Martins dos

HISTOPATOLOGIA E HIBRIZAÇÃO IN SITU DE CITOCROMO P450
(CYP2A1) EM OSTRAS *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS AO
FENANTRENO / Isis Mayna Martins dos Reis ; orientador,
Afonso Celso Dias Bainy ; coorientador, Eduardo Cargnin
Ferreira. - Florianópolis, SC, 2014.

102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Ecotoxicologia. 3. Ostra. 4.
Hibridização in situ. 5. CYP450. I. Bainy, Afonso Celso
Dias. II. Ferreira, Eduardo Cargnin. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

**Histopatologia e hibridação *in situ* de citocromo P450 (CYP2A1)
em ostras *Crassostrea brasiliana* expostas ao fenantreno**

Por

ISIS MAYNA MARTINS DOS REIS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dr. Afonso Celso Dias Bainy – *Orientador*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque

Dr. Ricardo Castilho Garcez

Aos meus pais e em especial para “meine hetzie”

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador Dr. Afonso Celso Dias Bainy, pela atenção e confiança no meu trabalho durante os 4 anos de envolvimento nas atividades do laboratório e principalmente pela orientação no mestrado. Obrigada pela oportunidade de adquirir tanto conhecimento.

Ao meu coorientador Eduardo Cargini Ferreira, pelos ensinamentos e supervisão ao longo desses anos.

Aos meus pais, pela educação privilegiada, carinho e dedicação. É impossível dimensionar a gratidão e o amor que sinto por vocês. Obrigada pelo o amor e apoio incondicional.

À minha querida Tamires, pela paciência, pelo carinho, por segurar a barra, pela confiança e por não enlouquecer junto comigo. Jamais esquecerei o seu apoio. Obrigada! Ich liebe dich für imme meine hetzie.

Aos meus irmãos: Aaron, Lisianne, Samara por todo carinho e apoio ao longo de todos esses anos, vocês são os meus anjos na Terra, amo vocês. Em especial, a minha irmã Dr^a Marilise, pelo apoio durante todo mestrado e principalmente nas leituras sobre a dissertação, te amo “cotinha”. E também, aos meus cunhados queridos Ata e Tiãozinho.

Às minhas amigas eternas: Dani, Feka, Karol pelo apoio e alegria. E é claro, aos respectivos maridos também: Thiago, Murilo e George.

Às minhas novas “queridas” amigas Rafaela, Betina e Preta, obrigada por todo o apoio e descontração nos momentos alegres e difíceis.

Ao meu time de futsal da UFSC, pelos momentos de diversão e fuga da pressão da dissertação. Obrigada a todas vocês!

Aos meus companheiros do LABCAI: Álvaro, Gabi, Tomas, Miriam, Laura, Barbara, Ju, Talita, Maya, Gabriel, Luiz, Maria, Cecília, Trevisan, Diego, Ana Solório e também ao Clei, Karin e Lila pelo apoio em projetos paralelos. Em especial a Camila, Daína, Romi e Miguelito por todos os momentos bons e trabalhosos que passamos no laboratório.

Ao Guilherme Toledo, por toda a ajuda no delineamento dos primers.

Ao Fabrício, gaúcho “mala”! Obrigada pelos puxões de orelha (essenciais), pelo apoio, conselhos, auxílio e parceria. Sem dúvida, foram muitos os aprendizados. “Aquele abraço”.

À queridíssima Flávia, pelo apoio e paciência desde a primeira PCR. No laboratório, sempre disposta a ajudar. Sem dúvida aprendi muito com você. Muitíssimo obrigada, Flavitcha!

Ao nosso “cabeção” Jacó. Faltariam folhas pra te agradecer. Você foi essencial para que a ISH acontecesse, obrigada por todo o auxílio, indicações de leitura, pelos puxões de orelha, e pela paciência. Principalmente, obrigada por acreditar em mim, até quando eu não acreditava mais.

Ao professor Dr. Ricardo Garcez pelo incentivo de utilizar a técnica de hibridização *in situ*. Deu certo!

À professora Dr^a Maria Risoleta pelo apoio e aprendizado.

À professora Dr^a. Aimê Rachel Magenta Magalhães por me proporcionar o primeiro estágio na área de malacocultura e por me auxiliar na formação acadêmica. À Ana Lúcia pelas orientações com as técnicas histológicas. E todo o apoio do pessoal do LAMEX.

Ao Laboratório de Moluscos Marinhos, que tem como responsável o professor Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo. Em especial ao Chico, pelas idas e vindas ao LABCAI no fornecimento das microalgas e ao Carlos Henrique “Tatuzinho” por fornecer as ostras utilizadas nos experimentos e pela logística na aclimação e incentivo no experimento.

Ao pessoal do Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - IO/USP pelas análises químicas realizadas.

À UFSC, e a todos os professores da Pós-Graduação em Aquicultura, pelos ensinamentos e aprendizado, e ao Carlito Klunk, pelo auxílio, paciência e compreensão nas questões administrativas.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto Universal **UNIVERSAL - MCTI/CNPq N° 14/2012 (483028/2012-6)**.

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

*Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.*

Martin Luther King

RESUMO

Atividades relacionadas á aquicultura marinha, tais como, a ostreicultura tem sido ameaçada em função do comprometimento da qualidade da água. O fenantreno é um dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) mais abundantes e distribuídos no ambiente aquático. Bivalves expostos a este composto mostraram efeitos nos diferentes tecidos. Este estudo avaliou em laboratório, os efeitos e alterações moleculares e histológicas que o fenantreno exerce sobre a ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), ao longo de 10 dias de exposição nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Técnicas histológicas, histoquímicas, e a técnica de hibridização *in situ* (ISH) foram utilizadas para localizar os principais tecidos que apresentam transcrição do gene citocromo P450 (*CYP2AUI*). Foi realizada também a identificação sexual e do estágio reprodutivo dos animais. Independente da concentração de exposição ao fenantreno, os níveis de bioacumulação pelas ostras aumentou com o passar do tempo de exposição. Foram observadas alterações histológicas na glândula digestiva e no manto dos animais expostos por 10 dias a fenantreno. As ostras expostas à maior concentração de fenantreno apresentaram um aumento significativo de células mucosas ($p < 0,05$) em relação ao controle e aquelas expostas a menor concentração de fenantreno tiveram uma maior atrofia na glândula digestiva. Quanto à localização dos transcritos do gene do *CYP2AUI* observamos reação positiva na brânquia, glândula digestiva, manto, intestino e gônadas. Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o uso da técnica de ISH foi eficaz para localizar os transcritos do *CYP2AUI* em diferentes órgãos da ostra *C. brasiliiana*, além da importância na identificação de possíveis alterações histopatológicas decorrentes da exposição a fenantreno.

Palavras-chave: Aquicultura, Ecotoxicologia, Ostra, Hibridização *in situ*, *CYP450*.

ABSTRACT

Activities related to marine aquaculture, such as oyster farming have been threatened due to the impairment of water quality. Phenanthrene is one of the most abundant and distributed polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in the aquatic environment. Bivalve molluscs exposed to this compound have shown effects in different tissues. This study evaluated under laboratory conditions, the molecular and histological changes and effects of phenanthrene on the oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819), over 10 days of exposure at concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Histological, histochemical, and in situ hybridization (ISH) techniques were used to identify the transcription sites of cytochrome P450 isoform (*CYP2A1*). Sex and reproductive stage were identified in all organisms. Independent of the phenanthrene exposure concentration, levels of bioaccumulation by oysters have increased along the exposure period. Histological changes were observed in the digestive gland and in the mantle of animals exposed for 10 days to phenanthrene. Oysters exposed to higher concentrations of phenanthrene showed a significant increase of mucosal cells ($p < 0.05$) compared to the control and those exposed to lower concentrations of phenanthrene had greater atrophy in digestive gland. As for the location of the *CYP2A1*, gene transcripts showed positive reactions on gill, digestive gland, mantle, gut and gonads. The results observed in this study have shown that the use of the ISH technique was effective to locate the transcripts of *CYP2A1* in different organs of oyster *C. brasiliana*, besides the importance in identifying possible histopathological changes arising from exposure to phenanthrene.

Key words: Aquaculture, Ecotoxicology, Oyster, *In situ* hybridization, *CYP450*.

LISTAS FIGURAS

Figura 1: Mapa global do impacto antrópico em ecossistemas costeiros e oceânicos..	27
Figura 2: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais.	32
Figura 3: Esquema representando a imunodeteccção por reação colorimétrica, da sonda hibridizada com a seqüência alvo.	36
Figura 4: Manutenção das ostras <i>Crassostrea brasiliiana</i> nos aquários de vidro, cobertos por caixas plásticas para minimização da contaminação por fenantreno no ar.	45
Figura 5: Ostra da espécie <i>Crassostrea brasiliiana</i> , demonstrando o corte da seção transversal realizado para as análises histológicas.....	46
Figura 6: Etapas da técnica de ISH para localização do <i>CYP2AU1</i> na ostra <i>Crassostrea brasiliiana</i>	53
Figura 7: Corte transversal de brânquias, intestino e estômago da ostra <i>Crassostrea brasiliiana</i> do grupo controle (CT) e expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2) por 10 dias.....	57
Figura 8: Corte transversal da ostra <i>Crassostrea brasiliiana</i> expostas a 10 dias a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1) e grupo controle (CT), mostrando a atrofia dos (t) túbulos das glândulas digestivas..	58
Figura 9: Corte transversal do manto de ostras <i>Crassostrea brasiliiana</i> controle e expostas a fenantreno durante 10 dias.....	60
Figura 10: Percentual de células mucosas no manto de ostras <i>Crassostrea brasiliiana</i> expostas a 100 e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno e grupo controle	61
Figura 11: <i>Dot Blot</i> para hibridização da sonda antisense (positivo) com o RNA de <i>Crassostrea brasiliiana</i> e a ausência de hibridização com a sonda sense (negativo).	62
Figura 12: Lâminas da ostra <i>Crassostrea brasiliiana</i> contendo a sonda sense (controle negativo da técnica) contra o RNAm, sem a deteccção do sinal (azul/arroxeadado) em ostras do grupo controle (A) e exposto a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (B).....	63
Figura 13 Localização dos transcritos do <i>CYP2AU1</i> nas brânquias e glândula digestiva da ostra <i>Crassostrea brasiliiana</i> do grupo controle	

(CT) e expostas a 1000 µg.L-1 de fenantreno (T2) por 10 dias, hibridizadas com sonda antisense. 64

Figura 14: Localização dos transcritos do *CYP2AUI* no intestino e manto da ostra *Crassostrea brasiliana* do grupo controle (CT) e expostas a 1000 µg.L-1 de fenantreno (T2) por 10 dias, hibridizadas com sonda antisense..... 65

Figura 15: Localização do *CYP2AUI* nas gônadas da ostra *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 µg.L-1 de fenantreno por 5 dias. (A-D) Ostras hibridizadas com sonda antisense..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Código e sequência dos iniciadores específicos utilizados. . 49

Tabela 2: Níveis de bioacumulação de fenantreno de *pools* de ostras *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno e grupo controle (sem adição de fenantreno) coletadas após 1, 5 e 10 dias de exposição..... 56

Tabela 3: Marcadores histopatológicos para análise estrutural de glândula digestiva de ostras *Crassostrea brasiliana*. 59

Tabela 4: Distribuição do número de animais (n=72) ao longo dos 10 dias de exposição ao fenantreno, identificação sexual e seus respectivos estádios reprodutivos. 61

Tabela 5: Avaliação semi-quantitativa de ISH (sonda *antisense*), com sinal positivo (azul/arroxeadado). 66

LISTA ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ASB: albumina de soro bovina; do inglês *albumin serum bovine* (BSA)
- BLAST: algoritmo para comparação de sequências biológicas utilizando alinhamento local; do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
- BAMHI: enzima de restrição, derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*
- BCIP: do inglês *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*
- cDNA: sequência nucleotídica complementar de DNA
- cm: centímetros
- cél.mL⁻¹: células por mililitro
- CT: Controle
- CYP450 (ou CYP): citocromo P450 – número após a sigla representa família
- CYPs: citocromos P450
- CYP1A*: citocromo P450 família 1A
- CYP2*: citocromo P450 família 2
- CNPq - Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- DH5 α : linhagem de bactéria competente de *Escherichia coli*
- DNases: enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA.
- DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DIG: digoxigenina
- DNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados.
- DTT: ditioneitol
- ECORI: enzima de restrição isolada a partir de cepas de *Escherichia coli*
- ECORV: enzima de restrição do tipo II, isolada de certas estirpes de *Escherichia coli*.
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- ESTs: acrônimo do inglês *expressed sequence tag*
- EUA: Estados Unidos da América
- GeneBank* - Banco de genes público que possui os dados produzidos pelo NCBI.
- h: horas
- HCl: ácido clorídrico
- HHE: hematoxilina de Harris e Eosina
- HPA - hidrocarboneto policíclico aromático
- HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IDT: acrônimo do inglês *integrated DNA Technologies*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISH: acrônimo do inglês *in situ hybridization*
IO-USP: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo -
Laboratório de Química Orgânica Marinha.
IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo.
jPCR: software Java de ferramentas para PCR
k: K-endopeptidase
KCl: cloreto de potássio
LB: Luria-Bertani (Meio de Cultura).
M: molar
MPCw: acrônimo do inglês *maximum permissible concentration in water*
MABT: tampão com ácido maléico, NaCl e Tween 20
MACeco: acrônimo do inglês *maximum acceptable concentration in ecosystems*
mM: milimolar
NaCl: cloreto de sódio
NBT: acrônimo do inglês nitro-blue tetrazolium chloride
NCBI: acrônimo do inglês National Center for Biotechnology Information
NaOH: hidróxido de sódio
°C: graus Celsius
p: significância estatística
pb: pares de base
PBS: tampão fosfato salino
PCB: bifenilas policloradas
PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*
rATP: ribonucleotídeo de adenina trifosfatado
rCTP: ribonucleotídeo de citosina trifosfatado
rGTP: ribonucleotídeo de guanina trifosfatado
RNases: nuclease que cataliza a degradação do RNA
RNAm - ácido Ribonucleico mensageiro
rpm: rotações por minuto
rRNA: RNA ribossomal
rUTP: ribonucleotídeo de uracila trifosfatado
SP6: RNA Polimerase de *Salmonella typhimurium*
SSC: tampão cloreto de sódio e citrato trissódico.
SLS: tampão sódio lauril sulfato

SDS: tampão sódio dodecil sulfato

Tris: tampão tris

TA: temperatura ambiente

TBE: tampão tris base, ácido bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético

T1: Tratamento 1

T2: Tratamento 2

T7: RNA Polimerase de T7 de bacteriófago

Tris-HCl: tris (hidroximetil) aminometano-hidrocloro

U: unidade

USP: Universidade de São Paulo

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranósido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	25
1.1 A problemática da poluição no habitat marinho.....	25
1.2 O desafio atual da aquicultura nos ecossistemas costeiros.....	26
1.3 O impacto da poluição na ostreicultura de Santa Catarina.....	28
1.4 A ostra <i>Crassostrea brasiliana</i> (LAMARCK, 1819).....	29
1.5 Fenantreno.....	31
1.6 Histopatologia como biomarcador de efeito e poluição.....	33
1.7 Hibridização <i>in situ</i>	34
1.8 Os citocromos <i>P450</i> (CYPs).....	37
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	41
2. INTRODUÇÃO.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Coleta do material biológico e aclimação.....	44
3.2 Delineamento Experimental.....	44
3.3 Manutenção das ostras nos aquários.....	45
3.4 Análises histopatológicas.....	46
3.4.1 <i>Tratamento e preparação das amostras</i>	46
3.5 Análises Moleculares.....	48
3.5.1 <i>Seleção do gene</i>	48
3.5.2 <i>Extração de RNA total e síntese de cDNA</i>	48
3.5.3 <i>Desenho dos iniciadores e análises de PCR</i>	48
3.5.4 <i>Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase</i>	49
3.5.5 <i>Purificação, Clonagem, Digestão e Sequenciamento dos fragmentos dos produtos de PCR para confirmação do gene.</i>	50
3.5.6 <i>Preparação da sonda de RNA (Transcrição in vitro)</i>	51

3.5.7 Dot Blot.....	52
3.5.8 Hibridização <i>in situ</i>	53
3.6 Análises químicas das ostras <i>Crassostrea brasiliana</i>	54
3.7 Análise dos dados	54
4. RESULTADOS	56
4.1 Análise química das ostras	56
4.2 Alterações histopatológicas.....	57
4.3 Dot Blot.....	62
4.4 Hibridização <i>in situ</i>	63
5. DISCUSSÃO	68
5.1 Análises Histopatológicas	69
5.2 Localização de transcritos do <i>CYP2AUI</i> nos tecidos de <i>Crassostrea brasiliana</i>	74
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7. CONCLUSÕES.....	80
8. AGRADECIMENTOS	81
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	90
ANEXO A – Imagem do gel de eletroforese em agarose 2% do produto de PCR realizado após digestão do DNA plasmidial.....	102

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A problemática da poluição no habitat marinho

Vários fatores têm ameaçado a qualidade do ambiente marinho, tais como o lançamento de esgoto sanitário sem tratamento, eventos de derrames de petróleo, eutrofização (enriquecimento em nutrientes), aumento no descarte de poluentes orgânicos persistentes (POPs), acidificação das águas decorrentes do aquecimento global, aumento do lixo marinho, pesca excessiva, entre outros (BELLWOOD et al., 2004; McCOOK, 1999; NYSTRÖM et al., 2000).

Os efluentes gerados pela exploração, o refino e a distribuição de petróleo e seus derivados, podem causar eventos de exposição aguda e/ou crônica no ambiente marinho (KENNISH, 1992).

Embora acidentes envolvendo a atuação da indústria do petróleo tenham grande destaque na mídia, a contaminação crônica corresponde à maior parcela de petróleo introduzida nos ecossistemas costeiros. De acordo com Gabardo (2007) e Tiburtius e colaboradores (2005), o aporte crônico de petróleo e seus derivados pode ocorrer através do escoamento urbano, de efluentes industriais e domésticos, da navegação, do transporte, além de pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em pontos de distribuição.

A costa brasileira merece especial atenção, tendo em vista a tendência atual de crescimento econômico associado ao aumento da exploração de novas áreas petrolíferas, impondo um risco maior de exposição dos organismos marinhos (LUCHMANN, 2012).

Segundo o Greenpeace (2014), a região Sul do Brasil não tem na indústria de petróleo o seu principal alvo de pesquisa em relação a exploração e produção petrolífera, uma vez que a maioria dos blocos de exploração está localizada nas bacias do pré-sal, entre Rio de Janeiro e São Paulo, ou seja, na região sudeste. No entanto, com a expansão das áreas de exploração pela Bacia de Santos, em poucos anos esta região também deverá ser motivo de preocupação.

A região Sul, com destaque para o estado de Santa Catarina, é o principal produtor industrial de pescados do Brasil. Neste Estado encontra-se 26,2% do volume total anual de toda a produção pesqueira do país, o equivalente a 115 mil toneladas. Além disso, o Estado é o maior produtor de ostras e mexilhões do Brasil. Trata-se de uma fonte importante de renda e de suprimento para a indústria alimentícia

nacional, mas que está sob constante ameaça, visto que o saneamento desta região está muito deficiente e o grande montante de investimentos volta-se para fontes de energias poluidoras, como o petróleo, principal matriz energética brasileira (EPE, 2014; EPAGRI, 2013; GREENPEACE, 2010).

Essa combinação de vetores de impacto demanda medidas preventivas para avaliar, monitorar e, em muitos casos, evitar atividades impactantes sobre nossos ecossistemas, especialmente os costeiros (LUCHMANN, 2012).

1.2 O desafio atual da aquicultura nos ecossistemas costeiros

A aquicultura depende fundamentalmente dos ecossistemas nos quais está inserida, sendo a qualidade das águas de cultivo uma das principais preocupações dos setores de pesquisa e fomento desde o início da atividade (VALENTI, 2002).

Sabe-se que o aumento da pressão sobre os recursos naturais, com destaque para ambientes aquáticos, deve-se, em grande parte, ao crescimento populacional mundial das últimas décadas. Esse aumento evidencia a dependência do homem por bens e serviços ambientais no desenvolvimento de diversas atividades econômicas (HALPERN et al., 2008; LINS et al., 2010; MOREL, 2004).

Observando o mapa global de impacto antrópico marinho costeiro e oceânico (Figura 1A), as regiões fortemente atingidas são a costa leste da América do Norte, o Mar do Norte, os mares que banham a China, o Mar do Caribe, o Mar Mediterrâneo, o Mar Vermelho, o Golfo Pérsico, o Oceano Pacífico ocidental. Um exemplo de impacto causado pela atividade humana na América Latina e no Caribe são as águas residuais despejadas sem tratamento que chegam perto de 80%. Outro exemplo são as águas residuais não tratadas e despejadas em grande parte da África e Indo-Pacífico, onde a proporção é muito alta, chegando a marca de 80-90% (UNEP/GPA, 2006).

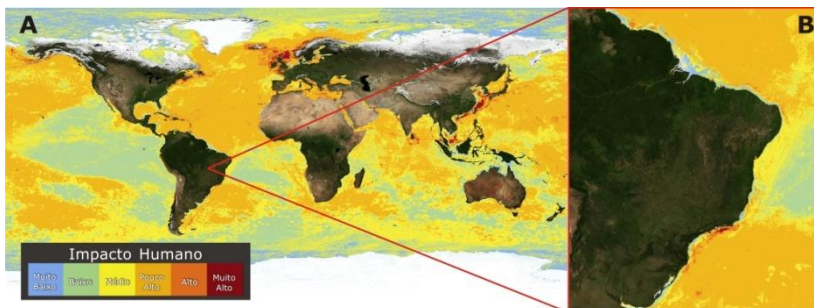


Figura 1: A) Mapa global do impacto antrópico em ecossistemas costeiros e oceânicos. A escala de impacto foi definida pelos autores, varia de locais muito pouco impactados (azul) ao mais impactado (vermelho). B) Destaque do impacto na região sudeste na costa brasileira (modificado de HALPERN et al., 2008).

Segundo a UNEP/GPA (2006), um valor estimado de US\$ 56 bilhões é anualmente destinado para solucionar o problema das águas residuais. Ainda que o montante seja de bilhões de dólares, o tratamento de águas residuais é uma das áreas onde há menos investimento global (DODDS et al., 2007). Além desse fator, aliado a isso, está a má gestão do esgoto, que ameaça os serviços de saúde e os ecossistemas (UNEP/GPA, 2006).

De acordo com Halpern e colaboradores (2008), a costa brasileira pode ser classificada como média ou altamente impactada, e algumas regiões, como a Sudeste, apresentam níveis alarmantes de influência humana (Figura 1B). O impacto do esgoto sanitário é uma das principais fontes de poluição nos ecossistemas marinhos (ABESSA et al., 2005; MARTINS et al., 2008; KENNISH, 1992). Segundo a última edição do Atlas de saneamento 2011, aproximadamente 45% dos municípios brasileiros não possuem rede de coleta de esgoto (IBGE, 2011).

Mesmo que o crescimento econômico observado nos últimos anos seja inquestionável, o Brasil continua sendo um país em desenvolvimento, cujas necessidades essenciais, como saneamento, estão muito aquém da oferta existente (BAER, 2008).

Por outro lado, os países em desenvolvimento têm desempenhado um papel importante no abastecimento de pescados nos mercados globais. Em 2012, esses países contribuíram com mais de 60% do total das exportações de pescados (FAO, 2014).

A aquicultura apresenta-se como atividade economicamente emergente (ELER; MILLANI, 2007). Segundo as últimas informações da FAO, desde 2000 a produção aquícola mundial mais do que dobrou, atingindo mais de 70 milhões de toneladas em 2013 (FAO, 2014).

Atividades relacionadas à aquicultura marinha, tais como, ostreicultura, mitilicultura e piscicultura têm sido ameaçadas em função do comprometimento da qualidade da água, decorrente do lançamento de contaminantes antrópicos nas zonas costeiras (BAYEN; LEE; OBBARD, 2007; DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009; FAO, 2007).

Compreende-se que essas atividades, coparticipantes na crescente demanda por alimento de boa qualidade nutricional, enfrentam o desafio de moldar-se ao conceito de sustentabilidade, implicando em novos valores à produção de conhecimento e às práticas do setor (ELER; MILLANI, 2007). Diante destas perspectivas, existe uma preocupação quanto ao futuro da aquicultura, frente a uma condição de crescente contaminação dos ecossistemas costeiros. Surge, portanto o desafio de avaliar e monitorar a gestão de águas residuais e esgotos de fontes difusas lançados no ambiente marinho (VELDHOEN et al., 2012).

1.3 O impacto da poluição na ostreicultura de Santa Catarina

No Brasil, o cultivo de ostras ocorre basicamente com três espécies do gênero *Crassostrea*: as ostras nativas *C.rhizophorae* (GUILDING, 1828), *C. brasiliiana* (LAMARCK, 1819) = *C. gasar* (ADANSON, 1757) e a ostra japonesa *C. gigas* (THUNBERG, 1793) (GOMES, 2009).

O cultivo de ostras também depende das condições dos sistemas marinhos, incluindo as áreas úmidas e regiões estuarinas, bem como as bacias de recepção e drenagem e as águas interiores próximas à costa (VAZ, 2012). Essas condições podem ser alteradas pelas mudanças climáticas, florações de algas tóxicas, poluição química e microbiana (MOURA et al., 2011).

A primeira produção comercial de *C. gigas* em Santa Catarina foi registrada em 1991, no município de Florianópolis. Em 2006 a produção atingiu 3.152,4 toneladas, porém, em 2007, houve uma redução drástica de mais de 60%. Essa queda foi associada principalmente a problemas de comercialização, sendo Florianópolis e

Palhoça os principais municípios produtores atingidos (FERREIRA; OLIVEIRA NETO, 2006; OLIVEIRA NETO, 2008).

Em abril de 2008, outro fator que interferiu na venda de ostras e mexilhões na baía sul de Florianópolis foi a floração de algas vermelhas. A comercialização destes moluscos foi proibida na principal área de cultivo em Santa Catarina (BRANDO, 2008).

Já em janeiro de 2014, a Justiça Federal interditou o cultivo de moluscos na Grande Florianópolis e exigiu estudos de impacto ambiental. Essa interdição ocorreu devido ao vazamento de óleo no início do mês de dezembro, na subestação desativada da Celesc, na localidade de Tapera, Sul da Ilha de Santa Catarina. Esta área foi considerada como supostamente contaminada com a substância bifenilapoliclorada (PCBs), conhecida no mercado como ascarel, (KREMER, 2014).

Esta interdição durou até o final do mês de janeiro de 2014, quando a Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca e a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), informaram que as amostras de moluscos analisadas pelo Laboratório de Química Orgânica do IO-USP deram negativas para presença de PCBs. Com o resultado, a Secretaria da Agricultura e da Pesca e a CIDASC avaliaram que não existia restrições ao consumo de ostras, mariscos e berbigões naquela área (JVANOLLI, 2014).

1.4 A ostra *Crassostrea brasiliana* (LAMARCK, 1819)

Como já descrito anteriormente, no Brasil existem três espécies de *Crassostrea*: *C. gigas* (Thunberg, 1793), introduzida na década de 70 e duas espécies nativas: *C. brasiliana* (Lamarck, 1819) = *C. gasar* e *C. rhizophorae*. De acordo com o estudo de Melo e colaboradores (2010), baseado na homologia da sequência do gene RNAr 16S, a ostra *C. brasiliana* e *C. gasar* possuem sequências idênticas indicando que ambas pertencem à mesma espécie. Mesmo diante da identificação morfológica de espécies do gênero *Crassostrea* ser difícil e fortemente influenciada pelo ambiente (LAM; MORTON, 2003), e recentemente considerando as espécies *C. gasar* e *C. brasiliana* serem sinônimas, surge a necessidade urgente de estudos morfológicos para ambas as espécies (MELO et al., 2010).

Segundo a EPAGRI (2010), 10% da produção nacional de moluscos ocorrem com as espécies nativas *C. brasiliana* e *C. rhizophorae*. Nas últimas décadas, a produção de ostras no Brasil

cresceu consideravelmente e a ostra do mangue nativa *C. brasiliana* tem sido cada vez mais cultivada em áreas estuarinas brasileiras (PIE et al., 2006). Tal atividade gera empregos, ajuda a fixar populações nativas litorâneas em seu ambiente tradicional, atua como complemento de renda para pescadores artesanais e ainda auxilia na preservação ambiental, no que diz respeito à manutenção dos estoques naturais desta espécie e preservação dos locais onde os cultivos são implantados (FERREIRA; OLIVEIRA NETO, 2006).

Moluscos bivalves têm sido extensivamente utilizados como sentinelas para monitorar (biomonitores) entrada de contaminantes em ambientes marinhos e de estuários (NOAA, 1993; O'CONNOR; BELIAEFF, 1995). Estes organismos são sésseis e se alimentam por filtração, características que lhes permite acumular produtos químicos em altas concentrações, inclusive acima dos encontrados na água circundante (OLIVER, et al., 2001).

Os bivalves (dentre eles, a ostra *C. brasiliana*) respondem negativamente aos xenobióticos, com diminuição da taxa e no potencial de crescimento (SINDERMANN, 1996). As ostras são animais bastante delicados e particularmente vulneráveis a doenças, predadores, poluição industrial e outros riscos naturais, o que explica, em parte, a oscilação entre crescimento e alterações no ciclo de produção das ostras (DORE, 1991).

De fato, existe uma relação entre certas patologias, exposição a contaminantes e a influência sobre o sistema imune dos bivalves. A diminuição da resposta imune leva a um aumento de doenças e parasitas, diminuindo o volume da gônada. Segundo Perdue e colaboradores (1983), o tecido da gônada das ostras pode ser responsável por 55% do total do peso seco de carne. Essas respostas podem inferir um possível prejuízo econômico indiretamente provocado pela contaminação de origem humana (SINDERMANN, 1996).

Além disso, a biotransformação de compostos orgânicos pelos bivalves levam à formação de metabólitos eletrofilicos reativos que podem se ligar covalentemente ao DNA formando adutos (DE MAAGD; VETHAAK, 1998). Como consequência, mutações podem resultar em neoplasias e tumores em bivalves (WOLOWICZ et al., 2005).

Diante destes fatores, o desenvolvimento ontogenético e a resistência frente a agentes estressantes podem ser afetados de forma substancial, levando a um retardo no crescimento ou até mesmo à morte de muitos organismos, sobretudo nas fases mais iniciais do

desenvolvimento (MARTIN; OSBORN; GLICKSTEIN, 1981). De fato, o desenvolvimento reprodutivo é um dos processos fisiológicos mais importantes no ciclo de vida de qualquer espécie de bivalve (ENRÍQUEZ-DÍAZ et al., 2009).

Um dos principais obstáculos para o estabelecimento do cultivo de espécies nativas como, por exemplo, *C. brasiliiana*, é a produção em larga escala de sementes em laboratório. Um dos fatores limitantes para esta produção é a imprevisibilidade na obtenção de reprodutores maduros oriundos do mar (GOMES, 2009), indivíduos que podem sofrer influência direta da má qualidade de água marinha.

Parte das fazendas de cultivo de Santa Catarina está assentada em baías que recebem influência de efluentes de rios, águas pluviais de vias de tráfego e esgoto clandestino, reconhecidas fontes poluidoras (FLORES-NUNES, 2008; LÜCHMANN, 2012). Nessas fontes destaca-se a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Dentre eles, alguns têm recebido uma atenção especial, como o fenantreno, desde que foram reconhecidos como compostos potencialmente danosos e poluidores para o ambiente (FIGUEIREDO, 1999; VEIGA, 2003).

Estudos têm utilizado biomarcadores de respostas bioquímicas e moleculares em moluscos bivalves com o objetivo de avaliar e monitorar o impacto das atividades antrópicas, observando a bioacumulação de fenantreno em diferentes tecidos destes animais (FLORES-NUNES, 2008; FLORES-NUNES, 2013; LÜCHMANN, et al 2014).

1.5 Fenantreno

O fenantreno, é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) constituído por três anéis benzênicos, de baixo peso molecular, semi volátil, amplamente distribuído no meio aquático, considerado um composto bastante tóxico aos animais, exibindo amplo fator de bioacumulação em organismos aquáticos (FIGUEIREDO, 1999; HANNAM et al., 2010; OLIVEIRA et al, 2007). Segundo Albers (1995), por não possuírem sistemas de detoxificação bem desenvolvidos, os moluscos bivalves, tendem a bioacumular esses compostos mais intensamente.

Apesar de não ser caracterizado como um composto carcinogênico, o fenantreno, possui em sua estrutura, uma região de baía observada em outros HPAs considerados carcinogênicos e, portanto,

está incluído na lista de poluentes prioritários (Figura 2) pela USEPA (2009). A região de baía é uma região côncava formada pelas ramificações na sequência de anel benzênico. Compostos que possuem esta região possuem maior tendência à carcinogenicidade, pois tal organização dos átomos de carbono fornece um alto grau de reatividade bioquímica (BAIRD, 2002; JERINA et al., 1978)

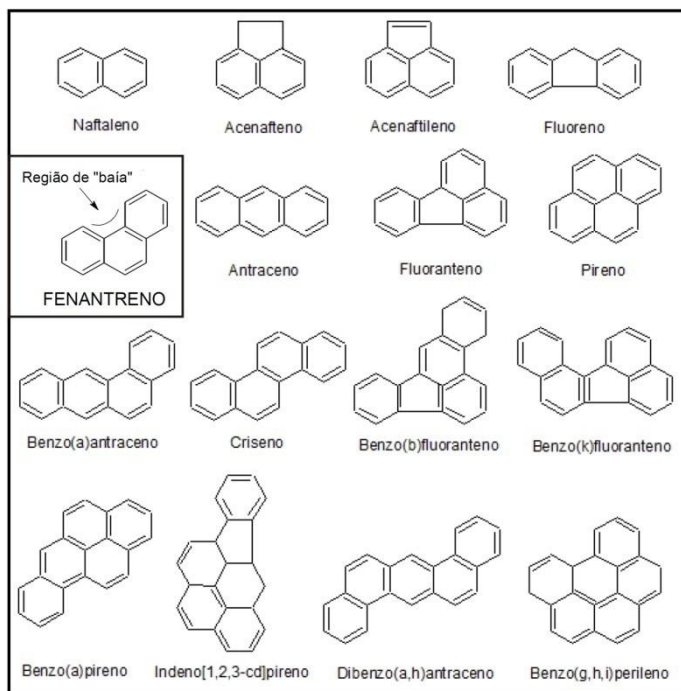


Figura 2: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Nesta figura estão os 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2009). Detalhe da estrutura do fenantreno com representação da região de baía (côncava).

Na legislação brasileira inexistem regulamentações específicas quanto à quantificação em sedimentos ou bioacumulação em organismos das concentrações limites máximas e mínimas, de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que poderiam comprometer a qualidade ambiental (PAVEI, 2007).

Limites de risco ambiental são utilizados em exames ecotoxicológicos, físico-químicos e dados toxicológicos humanos. Eles representam as concentrações ambientais de uma substância, oferecendo diferentes níveis de proteção para o homem e os ecossistemas (VERBRUGGEN; HERWIJNEN, 2011).

Um dos contaminantes mais abundantes e distribuídos no ambiente aquático dentre os HPAs é o fenantreno (SCHÄFER; KÖHLER, 2009).

Segundo o relatório de limites de riscos ambientais para o fenantreno de Verbruggen e Herwijnen (2011), são utilizados limites de risco ambiental para definir padrões de qualidade da água destinados para a Comissão de Coordenação Holandesa de Substâncias. Segundo este relatório, a concentração máxima permitida (MPCw) de fenantreno na água doce e salgada é de $1,1\mu\text{g.L}^{-1}$ (VERBRUGGEN; HERWIJNEN, 2011).

Exposição a este composto tem sido associado a moluscos bivalves demonstrando os efeitos causados nos diferentes tecidos desses organismos aquáticos (EINSPORN; KÖHLER., 2008; HANNAM et al., 2010; LÜCHMANN et al., 2014; MOORE et al., 1984; PICCARDO et al., 2001; SCHÄFER; KÖHLER 2009; SCHÄFER et al., 2011).

Contudo existe uma carência de estudos que comprovem que o fenantreno possa causar danos histopatológicos que comprometam a saúde das ostras. Por isso, a identificação de possíveis alterações teciduais decorrentes da exposição a fenantreno torna-se importante, podendo ser proposta como biomarcadores da contaminação aquática.

1.6 Histopatologia como biomarcador de efeito e poluição

A histopatologia é uma ferramenta que pode ser considerada como um excelente método de comprovação de danos em um nível de organização biológica superior aos moleculares e bioquímicos. Por isso a histologia patológica é utilizada em análises do efeito de xenobióticos sobre biomonitores (ALBINATI, 2009; LINS et al., 2010; HEATH, 1995; SCHWAIGER et al., 1997).

Os biomarcadores de efeito (histopatológicos) identificam alterações morfológicas celulares e subcelulares que podem ocorrer de forma direta e inicial e produzir um dano direto do tóxico no organismo, podendo afetar o crescimento e a competência reprodutiva (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Como um parâmetro integrador das alterações dos sistemas fisiológicos e bioquímicos (MYERS; FOURNE, 2002), a histopatologia é considerada uma ferramenta sensível, que permite avaliar a saúde do organismo de uma forma mais integrada (SEGNER; BRAUNBECK, 1988).

Isoladamente, a histopatologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais não especificando a causa pontual da lesão, ou seja, não diagnostica a contaminação, mas sim resposta biológica à agressão, ou ao estresse (LINS et al., 2010). No entanto, quando associados a outros métodos de análises, estudos histológicos podem auxiliar no diagnóstico de patologias. Por exemplo, em moluscos bivalves tem-se usado as alterações histológicas para avaliar o estado da saúde e do ecossistema, pois estas fornecem informações sobre a frequência e distribuição de processos toxicopáticos e sua relação com as atividades humanas (COUCH, 1985; DA ROS; RIBA et al., 2004).

Neste estudo, além da utilização de técnicas histológicas de rotina, técnicas histoquímicas e de hibridização *in situ* foram também utilizadas para avaliar os possíveis danos biológicos causados pela exposição das ostras ao fenantreno.

1.7 Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* conhecida como ISH (*in situ* hybridization), é uma técnica que associa métodos tradicionais de histoquímica e imuno-histoquímica com métodos de biologia molecular (PETRIDIS et al., 2009). Esta técnica permite localizar um gene específico, parte de sua sequência, seus transcritos ou, ainda, qualquer sequência específica de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) em tecidos biológicos fixados e processados histologicamente, gerando informações sobre a distribuição dessas moléculas nos diferentes tecidos e tipos celulares de um determinado organismo (SILVA-VALENZUELA et al., 2006).

Ácidos nucleicos, assim como as outras macromoléculas, ocupam posições precisas nas células e tecidos, e uma grande quantidade de informação é perdida quando estas moléculas são extraídas das células. Por esta razão, têm sido desenvolvidas técnicas nas quais sondas de ácidos nucleicos são usadas para localizar sequências específicas de DNA/RNA, enquanto elas ainda estão nas células (ALBERTS et al., 1999).

Outras técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a detecção de RNAm ou DNA extraídos de tecidos, mas não permitem observar a distribuição dos transcritos ou RNA em um tipo de população celular, ou em áreas de diferentes tecidos. Além disso, a técnica de ISH permite relacionar a presença de genes e seus transcritos com os processos patológicos (SILVA-VALENZUELA, 2006).

Durante os últimos anos, os protocolos da técnica de ISH tornaram-se padrão nos laboratórios (BARROSO-CHINEA et al., 2007). Assim, em estudos ecotoxicológicos, além da utilização de ferramentas histológicas, imuno-histoquímica e histoquímicas, estão sendo introduzidas técnicas de ISH para a detecção de alterações causadas por contaminantes (COSTA et al., 2012; FASULO et al., 2008; ITOH; TAKAHASHI., 2007; SAKAMOTO et al., 2008; ZORITA et al., 2007).

A reação de ISH para detecção de RNAm vem concretamente se estabelecendo como uma técnica complementar à rotina histopatológica. A técnica de ISH envolve a marcação de nucleotídeos, fragmentos, ou sequências de DNA/RNA específicas, denominada sonda. Existem atualmente diversos processos para a marcação da sonda, podendo-se utilizar isótopos radioativos, fluorocromos ou outras moléculas marcadoras (SIVIERO, 2013).

No presente estudo foram utilizadas sondas de RNA, tendo como objetivo principal a ligação específica com o mRNA-alvo no tecido. A sonda foi marcada com a Digoxigenina (DIG). O método de marcação da sonda de RNA com Digoxigenina é baseado em um esteróide isolado das plantas *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*. Como as flores e as folhas dessas plantas são a única fonte natural de digoxigenina, o anticorpo anti-DIG não se liga a outros materiais biológicos tornando a marcação muito mais específica (EISEL; GRÜNEWALD-JANHO; KRUCHEN, 2002).

Nesse método, uma fita complementar de RNA marcada com a molécula digoxigenina (sonda) se liga complementarmente à sequência de mRNA-alvo no tecido. A fita de RNA é desnaturada e quando este processo é lentamente revertido, através da redução da temperatura, as fitas complementares se anelam formando os híbridos (fita marcada – sequência alvo). Então, a molécula ligada à sonda é detectada por um anticorpo conjugado com a enzima fosfatase alcalina, a qual, quando em contato com seu substrato, age sobre o mesmo gerando um precipitado de cor azul arroxeadado, sinalizando a localização da sequência-alvo (Figura 3).

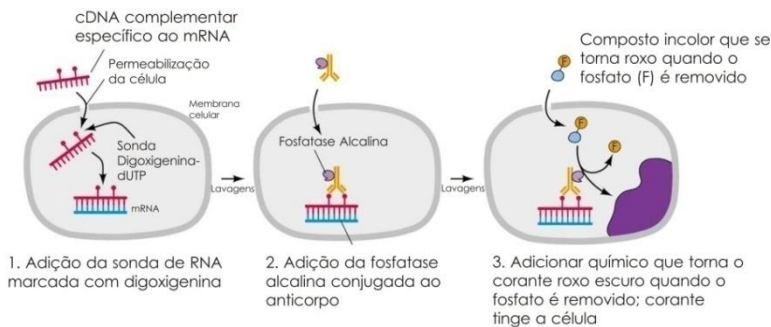


Figura 3: Esquema representando a imunodeteção por reação colorimétrica, da sonda híbrida com a sequência alvo (Adaptado de SCOTT, G.F., 2006).

Para o sucesso da reação é importante que a escolha da preparação citológica ou histológica seja a mais adequada. Cuidados com a degradação do RNA devem ser tomados desde o processamento dos tecidos. A fixação é uma etapa crítica na reação, pois uma fixação insuficiente pode resultar na perda do sinal de hibridização e na integridade morfológica (SIVIERO, 2013).

Já a eficiência da reação de ISH propriamente dita depende do estabelecimento correto de parâmetros que estão diretamente relacionados com as reações de desnaturação e anelamento, condição de desnaturação, temperatura de hibridização, concentração da sonda, presença de cátions na reação e composição da solução de hibridização (com ou sem formamida). Outras variáveis podem contribuir em alguns pontos importantes da elaboração dos experimentos, como tamanho e concentração da sonda, pareamento errôneo de base entre a sonda e o alvo (*mismatch*), lavagens da reação pós-hibridização e uso de uma sonda fita simples *versus* uma sonda fita dupla (SIVIERO, 2013).

Mesmo diante da complexibilidade da técnica, a ISH tornou-se uma técnica padrão em laboratórios (BARROSO-CHINEA et al., 2007). Quando comparado com os métodos imuno-histoquímicos para detectar proteínas, a ISH identifica o local ou a célula, em que uma dada proteína pode ser potencialmente sintetizada. Portanto, a ISH é um procedimento que pode produzir melhores resultados do que a imuno-histoquímica, principalmente quando as proteínas estudadas podem estar sendo expressas abaixo do limite de detecção da técnica imuno-histoquímica, ou sendo secretadas amplamente no meio extracelular (BARROSO-CHINEA et al., 2007).

1.8 Os citocromos P450 (CYPs)

Os citocromos P450 (CYPs) constituem uma ampla e diversificada família de proteínas pertencentes ao sistema de biotransformação de xenobióticos de fase I, agindo na detoxificação ou bioativação de drogas, fármacos, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (LÜCHMANN, 2012; SARKAR, et al., 2006; WAXMAN; AZAROFF, 1992). Por outro lado, muitos citocromos P450 possuem funções endógenas especializadas no metabolismo de moléculas sinalizadoras, como por exemplo, hormônios esteróides, eicosanóides (vertebrados) e ferormônios (REWITZ et al., 2006).

Em invertebrados marinhos, genes P450 e evidências bioquímicas de atividade P450, têm sido demonstrados nos grupos Cnidaria, Annelidae (poliqueta), Mollusca, Artropoda (Crustacea e Insecta) e Echinodermata (REWITZ et al., 2006). Os níveis de citocromo P450 total e atividade monoxigenase têm sido estudados em bivalves por décadas (LIVINGSTONE; KIRCHIN; WISEMAN, 1989; STEGEMAN, 1985).

Os P450 também apresentam enorme relevância quando se fala em regulação endócrina. Sabe-se que uma ampla variedade de poluentes químicos (compostos organoestânicos, metais pesados, herbicidas e compostos xenoestrogênicos/fitoestrogênicos) pode induzir anormalidades endócrinas em invertebrados. Entretanto, o mecanismo de ação de cada um destes agentes causais, raramente tem sido elucidado, principalmente devido à carência de informação sobre o sistema endócrino dos invertebrados (JANER; PORTE, 2007). Em alguns filos de invertebrados, como por exemplo, em moluscos e equinodermos, esteróides sexuais possuem um importante papel na produção e diferenciação sexual (JANER; PORTE, 2007).

Alguns estudos têm tentado detectar proteínas CYP1A, que são clássicos biomarcadores de exposição a contaminantes orgânicos. Contudo, a interpretação desses resultados em moluscos bivalves tem sido complicada por problemas metodológicos, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo de CYPs em bivalves (ZANETTE, 2009).

Com a aplicação de técnicas moleculares, por exemplo, muitas bibliotecas de sequências expressas (ESTs - acrônimo do inglês *expressed sequence tag*) em certas espécies de moluscos bivalves têm sido identificadas, bem como, tem fornecido informações extremamente

úteis para a elucidação de mecanismos bioquímicos e moleculares (LÜCHMANN, 2012; ZANETTE et al., 2010).

Investigações recentes realizadas em nosso laboratório (LÜCHMANN et al., 2014), comprovaram que a família do gene *CYP2* é a mais induzida por fenantreno, destacando-se altos níveis de expressão de RNAm para o *CYP2A1*, em brânquias e glândula digestiva de ostras *C. brasiliana* expostas a concentrações bem acima dos limites tolerados.

Diante da originalidade desse resultado, surgiu a necessidade de realizar um estudo sobre a transcrição desse gene sob diferentes concentrações de fenantreno e intervalos de tempo de exposição. Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* para caracterizar a transcrição do *CYP2A1* nos órgãos de *C. brasiliana* expostas ao fenantreno. Diferente de outros métodos moleculares, a hibridização *in situ* é uma técnica eficaz que permite observar a localização específica do RNA em tipos celulares de diferentes órgãos das ostras. Esta característica possibilita observar possíveis diferenças funcionais dos tipos celulares e a utilização de órgãos ainda não vistos como alvo em técnicas de estudos de biomonitoramento ambiental.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar, em laboratório, os efeitos e alterações moleculares e histológicas que o fenantreno exerce sobre a ostra *C. brasiliana* ao longo de intervalos de tempo de exposição, através da combinação das técnicas histológicas, histoquímicas e de hibridização *in situ*, visando à utilização destas técnicas nos programas de monitoramento ambiental. Dentre as respostas avaliadas estão a influência do fenantreno na histologia da glândula digestiva, análises histoquímicas no manto das ostras e a localização da transcrição do gene *CYP2A1* nos tipos celulares dos diferentes órgãos da ostra, através da técnica de *hibridização in situ*.

O artigo apresentado será submetido para a publicação na revista **Aquatic Toxicology**.

HISTOPATOLOGIA E HIBRIZAÇÃO *IN SITU* DE CITOCROMO P450 (*CYP2A1*) EM OSTRAS *Crassostrea brasiliiana* EXPOSTAS AO FENANTRENO

*Isis Mayna M. Reis**; *Eduardo C. Ferreira*²; *Jacó J. Mattos*¹; *Flávia L. Zacchi*¹; *F. Flores-Nunes*¹; *Ricardo C. Garcez*³; *Silvio T. Sasaki*⁴; *Márcia C. Bicego*⁴; *Satie Taniguchi*⁴; *Afonso C. D. Bainy*¹

¹ Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina - IFSC, Garopaba, SC.

³ Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC.

⁴ Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, SP.

*Corresponding author: isis_mmartins@hotmail.com

RESUMO

Atividades relacionadas á aquicultura marinha, tais como, a ostreicultura tem sido ameaçada em função do comprometimento da qualidade da água. O fenantreno é um dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) mais abundantes e distribuídos no ambiente aquático. Bivalves expostos a este composto mostraram efeitos nos diferentes tecidos. Este estudo avaliou em laboratório, os efeitos e alterações moleculares e histológicas que o fenantreno exerce sobre a ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), ao longo de 10 dias de exposição nas concentrações de 100 e 1000 µg.L⁻¹. Técnicas histológicas, histoquímicas, e a técnica de hibridização *in situ* (ISH) foram utilizadas para localizar os principais tecidos que apresentam transcrição do gene citocromo P450 (*CYP2A1*). Foi realizada também a identificação sexual e do estágio reprodutivo dos animais. Independente da concentração de exposição ao fenantreno, os níveis de bioacumulação pelas ostras aumentou com o passar do tempo de exposição. Foram observadas alterações histológicas na glândula digestiva e no manto dos

animais expostos por 10 dias a fenantreno. As ostras expostas à maior concentração de fenantreno apresentaram um aumento significativo de células mucosas ($p < 0,05$) em relação ao controle e aquelas expostas a menor concentração de fenantreno tiveram uma maior atrofia na glândula digestiva. Quanto à localização dos transcritos do gene do *CYP2A1* observamos reação positiva na brânquia, glândula digestiva, manto, intestino e gônadas. Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o uso da técnica de ISH foi eficaz para localizar os transcritos do *CYP2A1* em diferentes órgãos da ostra *C. brasiliiana*, além da importância na identificação de possíveis alterações histopatológicas decorrentes da exposição a fenantreno.

Palavras-chave: Histopatologia, ISH, poluição aquática, ostra, HPAs, fenantreno, *CYP2A1*.

ABSTRACT

Activities related to marine aquaculture, such as oyster farming have been threatened due to the impairment of water quality. Phenanthrene is one of the most abundant and distributed polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in the aquatic environment. Bivalve molluscs exposed to this compound have shown effects in different tissues. This study evaluated under laboratory conditions, the molecular and histological changes and effects of phenanthrene on the oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819), over 10 days of exposure at concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Histological, histochemical, and in situ hybridization (ISH) techniques were used to identify the transcription sites of cytochrome P450 isoform (*CYP2A1*). Sex and reproductive stage were identified in all organisms. Independent of the phenanthrene exposure concentration, levels of bioaccumulation by oysters have increased along the exposure period. Histological changes were observed in the digestive gland and in the mantle of animals exposed for 10 days to phenanthrene. Oysters exposed to higher concentrations of phenanthrene showed a significant increase of mucosal cells ($p < 0.05$) compared to the control and those exposed to lower concentrations of phenanthrene had greater atrophy in digestive gland. As for the location of the *CYP2A1*, gene transcripts showed positive reactions on gill, digestive gland, mantle, gut and gonads. The results observed in this study have shown that the use of the ISH technique was effective to locate the transcripts of *CYP2A1* in different organs of oyster *C. brasiliana*, besides the importance in identifying possible histopathological changes arising from exposure to phenanthrene.

Key words: Histopathology, ISH, aquatic pollution, Oyster, HPAs, phenanthrene, *CYP2A1*.

2. INTRODUÇÃO

A exploração, o refino e a distribuição de petróleo e seus derivados, podem causar eventos de exposição aguda e/ou crônica de seus efluentes (KENNISH, 1992).

Embora acidentes envolvendo a atuação da indústria do petróleo tenham grande destaque na mídia, a contaminação crônica corresponde à maior parcela de petróleo introduzida nos ecossistemas costeiros. De acordo com Gabardo (2007) e Tiburtius e colaboradores (2005), o aporte crônico de petróleo e seus derivados pode ocorrer através do escoamento urbano, de efluentes industriais e domésticos, da navegação, do transporte, além de pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em pontos de distribuição.

Atividades relacionadas à aquicultura marinha, tais como, ostreicultura, mitilicultura e piscicultura têm sido ameaçadas em função do comprometimento da qualidade da água decorrente do lançamento de contaminantes antrópicos nas zonas costeiras (BAYEN; LEE; OBBARD, 2007; DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009; FAO, 2007).

O fenantreno é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) constituído por três anéis benzênicos, de baixo peso molecular, semi volátil, amplamente distribuído no meio aquático, considerado um composto bastante tóxico aos animais, exibindo amplo fator de bioacumulação em organismos aquáticos (FIGUEIREDO, 1999; HANNAM et al., 2010; OLIVEIRA et al, 2007). Segundo Albers (1995), quando comparado a vertebrados, moluscos bivalves possuem baixa atividade de detoxificação de HPAs, por isso tendem a bioacumular esses compostos mais intensamente.

Apesar de não ser caracterizado como um composto carcinogênico, o fenantreno, está incluído na lista de poluentes prioritários pela USEPA (2009). O fenantreno é um dos contaminantes mais abundantes e distribuídos no ambiente aquático dentre os HPAs (SCHÄFER; KÖHLER, 2009). Exposição a este composto tem sido associado a moluscos bivalves demonstrando os efeitos causados nos diferentes tecidos desses organismos aquáticos (EINSPORN; KOEHLER., 2008; HANNAM et al., 2010; LÜCHMANN et al., 2014; MOORE et al., 1984; PICCARDO et al., 2001; SCHÄFER; KÖHLER 2009; SCHÄFER et al., 2011).

Contudo existe uma carência de estudos que comprovem que o fenantreno possa causar danos histopatológicos que comprometam a

saúde das ostras. Por isso, a identificação de possíveis alterações teciduais decorrentes da exposição a fenantreno torna-se importante, podendo ser proposta como biomarcadores da contaminação aquática.

Investigações recentes realizadas em nosso laboratório (LÜCHMANN et al., 2014), comprovaram que a família do gene *CYP2* ser a mais induzida por fenantreno, destacando-se altos níveis de expressão de RNAm para o *CYP2AUI*, em brânquias e glândula digestiva de ostras *C. brasiliiana* expostas a concentração de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A família de proteínas pertencentes ao sistema de biotransformação de xenobióticos de fase I, os citocromos P450, agem na detoxificação ou bioativação de drogas, fármacos, pesticidas e também de HPAS, como por exemplo, o fenantreno (LÜCHMANN, 2012; SARKAR et al., 2006; WAXMAN; AZAROFF, 1992).

Diante da originalidade desse resultado, surgiu a necessidade de realizar um estudo sobre a transcrição do gene *CYP2AUI* sob diferentes concentrações de fenantreno e intervalos de tempo de exposição. Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* para caracterizar a transcrição deste gene nos órgãos de *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno. Diferente de métodos bioquímicos que apenas quantificam o gene e de outros métodos moleculares, a hibridização *in situ* é uma técnica eficaz que permite observar a localização específica do RNA em tipos celulares de diferentes órgãos das ostras. Esta característica possibilita observar possíveis diferenças funcionais dos tipos celulares e a utilização de órgãos ainda não vistos como alvo em técnicas de estudos de biomonitoramento ambiental.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar, em laboratório, os efeitos e alterações moleculares e histológicas que o fenantreno exerce sobre a ostra *C. brasiliiana* ao longo de intervalos de tempo de exposição, através da combinação das técnicas histológicas, histoquímicas e de hibridização *in situ*. Dentre as respostas avaliadas estão à influência do fenantreno na histologia da glândula digestiva, análises histoquímicas no manto das ostras e a localização da transcrição do gene *CYP2AUI* nos tipos celulares dos diferentes órgãos da ostra, através da técnica de *hibridização in situ*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material biológico e aclimação

Ostras do mangue *Crassostrea brasiliiana* (= *Crassostrea gasar*) de 5-7,5 cm de altura (GALTSOFF, 1964), de mesmo lote e condições de cultivo foram coletadas (n =100) da estação do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC) localizado na praia de Sambaqui em Florianópolis, SC. As ostras foram transportadas até a sala de aclimação do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), na Barra da Lagoa (Florianópolis, SC), onde permaneceram por um período de aclimação de 7 dias, sob condições controladas: água do mar filtrada (poro de 0,45µm), temperatura constante (21°C), salinidade (25), aeração constante e alimentação de manutenção (8,0 x 10⁴ cél.mL⁻¹ *Isochrysis galbana*; 8,0 x 10⁴ cél.mL⁻¹ *Chaetoceros muelleri*).

3.2 Delineamento Experimental

Após o período de aclimação no LMM, as ostras foram transportadas imediatamente para a sala de bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI-UFSC) e acomodadas em aquários por 24 horas antes da exposição ao contaminante.

A exposição foi realizada em três aquários de vidro de 60 litros (n=50 ostras/aquário) sob condições controladas: água do mar filtrada (poro de 0,45 µm) sendo (1L de água do mar filtrada por animal), temperatura constante (21°C), salinidade (25), aeração e concentração nominal de fenantreno constante. Os aquários foram cobertos com tampa de vidro e acomodados dentro de caixas plásticas adaptadas com filtro de ar para diminuir a contaminação do ar por fenantreno no laboratório.

O experimento consistiu em um grupo controle com 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como veículo do fenantreno (CT); um grupo exposto a 100 µg.L⁻¹ (T1) de fenantreno e um grupo exposto a 1000 µg.L⁻¹ (T2). As duas concentrações de fenantreno foram escolhidas através de avaliações de estudos anteriores realizadas em *C.brasiliiana* (LÜCHMANN, 2014). O experimento foi realizado em regime semi-estático com renovação da água com DMSO, fenantreno

100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e fenantreno 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nos aquários controle (CT), T1 e T2, respectivamente, a cada 24 horas (Figura 4).



Figura 4: Manutenção das ostras *Crassostrea brasiliiana* nos aquários de vidro, cobertos por caixas plásticas para minimização da contaminação por fenantreno no ar. CT) Ostras do grupo controle sem contaminante (0,01% de DMSO). T1) Grupo de ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o grupo exposto a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (T2).

A solução estoque foi utilizada a cada 24 horas até o final do experimento, para manter as concentrações iniciais da exposição. O efluente líquido gerado diariamente no experimento foi tratado com carvão ativado e posteriormente descartado. O processamento e as análises das ostras foram realizadas no LABCAI/UFSC e no Laboratório de Malacologia Experimental (LAMEX- UFSC), do NEPAQ- Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola.

3.3 Manutenção das ostras nos aquários

Durante todo o período de exposição, as ostras foram alimentadas uma vez ao dia, com a mesma dieta da aclimação, duas horas antes da exposição na seguinte sequência: esvaziamento dos aquários - renovação com água do mar limpa - alimentação por 2h – esvaziamentos dos aquários - renovação da água de acordo com o delineamento (CT, T1, T2).

Grupos de 10 ostras foram coletados de cada tratamento (T1 e T2) e controle (CT) após 1, 5 e 10 dias de exposição, sendo os animais medidos, pesados e dissecados para a coleta de tecidos para análises químicas, histológicas e moleculares.

3.4 Análises histopatológicas

3.4.1 Tratamento e preparação das amostras

Para as análises histológicas, tecidos de oito ostras de cada grupo (tempo e concentração) foram retirados das conchas e realizada a macrotomia em plano transversal retirando-se a região mediana do corpo com aproximadamente 0,5 cm de espessura. A região do corte inclui glândula digestiva (ou divertículo digestivo), brânquias, gônadas e manto, além de parte do intestino e estômago. O corte abrange o final do palpo labial e início da brânquia na região inferior e o final da glândula digestiva na região superior do corpo do animal (Figura 5). Estas amostras foram acomodadas em histocassetes identificados e imediatamente fixados em formol tamponado (PBS; pH 7,3; 0,1M) nos três períodos de coletas (1, 5 e 10 dias).

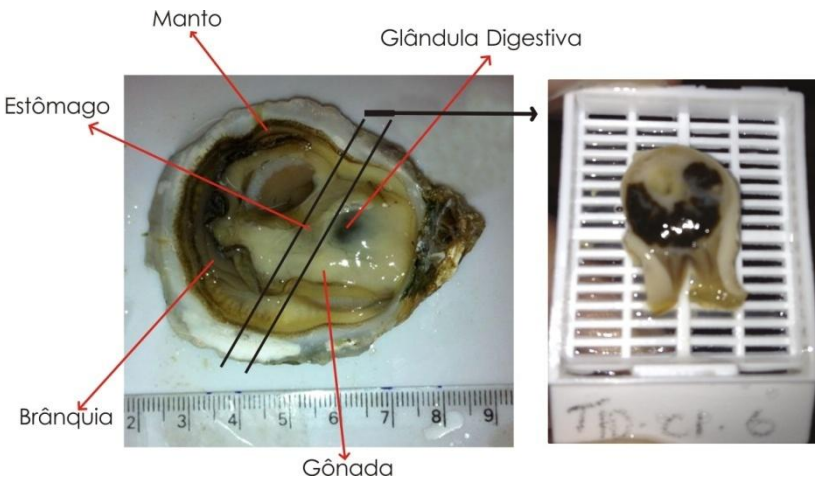


Figura 5: Ostra da espécie *Crassostrea brasiliana*, demonstrando o corte da seção transversal realizado para as análises histológicas. A seta indica o local da macrotomia, com detalhe do corte transversal dos órgãos em histocassete identificado.

Decorridas aproximadamente 48 horas de fixação, os cortes da seção transversal das ostras foram processados para evitar a degradação do RNA nos tecidos. O processamento histológico seguiu uma rotina de desidratação e inclusão (MARTOJA; MARTOJA-PIERSON, 1970) em

processador automático de tecidos (Lupetec, PT05), onde o álcool, xilol e parafina eram livres de RNases e DNases.

Os blocos histológicos de parafina foram submetidos à microtomia (5 μ M) em micrótomo rotativo (Lupe, MRP03). Os cortes foram estirados e recolhidos em um banho termostático (Fanem, 100) a 52°C.

Os cortes das ostras para as análises histológicas de rotina foram montados em lâminas de vidro (Prolab). Para a análise de ISH, os cortes foram montados em lâminas de vidro silanizadas (Sigma), pré-aquecidas por 24 horas em estufa (Deleo, DLSO2) a 70°C.

As lâminas de cada animal foram montadas e destinadas para as análises histológicas, histoquímicas e de ISH. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina - HHE (HOWARD; SMITH, 1983). Também foram realizadas técnicas histoquímicas coradas com *Alcian Blue* seguindo metodologia adotada por Cargnin-Ferreira e Sarasquete (2008), para detectar a presença de células mucosas no manto.

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Carl Zeiss Primo Star iLED). O diagnóstico das análises histopatológicas foi realizado por um só indivíduo.

As lesões ou alterações histopatológicas nos órgão-alvo (manto, glândula digestiva, brânquia, gônada e estômago) das ostras *C. brasiliiana* foram relacionadas a uma escala semi-quantitativa da intensidade do efeito ou da extensão da área afetada.

As possíveis alterações diagnosticadas nas brânquias foram quantificadas através da contagem da frequência de cada alteração, seguindo a metodologia adotada por Carballeira e colaboradores (2011). Para uma avaliação de possíveis alterações na glândula digestiva, foi realizada uma análise visual dos túbulos, avaliadas de forma semi-quantitativa de acordo com Ellis e colaboradores (1998).

Métodos de ácidos mucopolissacarídeos (coloração por *Alcian Blue*) foram utilizados para detectar a presença de células mucosas no manto e a quantificação foi realizada por contagem *alcian blue* positivas, utilizando-se o *software Image J 1.47t* (Fiji).

Também foram avaliadas a presença de inflamação dos tecidos, de edema, neoplasias e tumores, seguindo a metodologia proposta por Ellis e colaboradores (1998).

A determinação das fases do ciclo reprodutivo (Gametogênese, Repleção/Pré-desova, Desova Parcial, Desova Total, Repouso ou

Indeterminado) foi baseada nas classificações qualitativas da ostra *C.brasiliana* segundo Ramos e colaboradores (2014).

Adicionalmente, oito amostras de manto e brânquia de cada grupo (mesmas ostras utilizadas nas análises histológicas) foram preservadas em RNA later (Sigma - Aldrich) e mantidas em gelo até serem armazenadas em freezer -80°C para análises moleculares posteriores. Além disso, foram coletados *pools* de ostras (50g) por tratamento, nos três períodos de exposição, para as análises químicas.

3.5 Análises Moleculares

3.5.1 Seleção do gene

O gene da isoforma de citocromo P450 *CYP2AUI* foi escolhido para os estudos de ISH por ter sido aquele, dentre outras isoformas de citocromo P450, que apresentou uma maior taxa de transcrição em ostras *C. brasiliana* expostas a fenantreno (LÜCHMANN et al., 2014). A sequência do gene escolhido passou por um processo de montagem de sequências (“*assembly*”) utilizando o programa CAP3 (Sequence Assembly Program) (HUANG, MADAN, 1999).

3.5.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das brânquias utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do material extraído foi checada a partir das leituras de 260nm/280nm em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop, Technologies) e as amostras foram armazenadas a -80°C.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit Omniscript™ Reverse Transcriptase (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas como descrito anteriormente e armazenadas a -20°C para análises posteriores.

3.5.3 Desenho dos iniciadores e análises de PCR

Uma das preocupações iniciais para o desenho de iniciadores específicos para *CYP2AUI* era o fato de que existiam múltiplas sequências de RNAm identificadas no transcriptoma de *C. brasiliana* semelhantes a este gene, pertencentes à sub-família CYP2. Assim, 31 sequências homólogas ao gene (*CYP2AUI*) foram obtidas do banco de

dados e alinhadas juntamente com outras sequências homólogas ao gene (*CYP2AUI*), de outras espécies próximas evolutivamente, que estavam disponíveis no GeneBank. Estas sequências foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 2011). A tradução deduzida das sequências de nucleotídeos para aminoácidos foi realizada através do serviço *Translate a DNA Sequence* (<http://www.vivo.colostate.edu>), e as mesmas foram utilizadas pelo programa de bioinformática BLAST – Protein blast (*blastp*), disponível como serviço online na web site do NCBI, para identificação de sequências homólogas ao gene (*CYP2AUI*).

As regiões que apresentaram a menor conservação entre as espécies foram escolhidas para o desenho de iniciadores específicos, visando amplificar uma região interna do gene de aproximadamente 500pb. Para isto, foi utilizado o software Primer3plus e também os anelamentos foram testados utilizando o programa jPCR (*Java web tools*) visando especificidade para o gene *CYP2AUI*. Os pares de iniciadores, mostrados na Tabela 1, foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT).

Tabela 1: Código e sequência dos iniciadores específicos utilizados.

Código	Sequência dos iniciadores 5' – 3'
P2	<i>Forward</i> TGCAGGCCCCACAGAAATC
P2	<i>Reverse</i> CATTTTTCCTGTTTTACGCTTTTT
P4	<i>Forward</i> TGCAGGCCCCACAGAAATC
P4	<i>Reverse</i> CTTTAGGGACGTGGATGCATTCA
P5	<i>Forward</i> TGCAGGCCCCACAGAAATC
P5	<i>Reverse</i> TCTGTTCCCTTGTGTATGGCA
P16	<i>Forward</i> CTCTGATTTGGAGGCTGACG
P16	<i>Reverse</i> ATGCATCCACGTCCCTAAAG
P23	<i>Forward</i> CACTCTGATTTGGAGGCTGAC
P23	<i>Reverse</i> ATGCATCCACGTCCCTAAAG

3.5.4 Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase

O kit Advantage 2 PCR mix (Clontech) foi utilizado na padronização das condições de PCR, realizado no termociclador T-

Gradient (Biometra), para a amplificação do fragmento de tamanho esperado (672pb). O programa foi modificado para uma reação de PCR *Touchdown* (DON et al., 1991; ROUX, 1995), com um ciclo inicial de desnaturação de temperatura 94°C durante 2 minutos, seguida de parâmetros de ciclagem que desceram 1 grau na temperatura de anelamento (55°C até 50 °C) com ciclos de 25 vezes e, por fim, 72°C por 10 minutos para desativação da enzima Polimerase. Após a PCR e digestão com a enzima ECORI (Invitrogen), o produto final de 672pb foi analisado em gel de TBE 1x/agarose 2% (Anexo A).

3.5.5 Purificação, Clonagem, Digestão e Sequenciamento dos fragmentos dos produtos de PCR para confirmação do gene.

O produto da reação com tamanho esperado (672 bp) foi purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 2µl para quantificação do cDNA em 260nm e 280nm no espectrofotômetro (NanoDrop, Technologies) e, o restante, utilizado para a clonagem.

Após a purificação, foi utilizado o kit para clonagem TOPO® TA Cloning ®kit Dual Promoter, no qual o inserto foi ligado ao vetor do kit (pCRtm II – Topo® vector) contendo os promotores T7 e SP6 polimerases de cada lado do plasmídeo, com posterior transformação de bactérias cálcio competentes DH5α através de choque térmico a 42°C.

As bactérias transformadas foram incubadas em placa de ágar 35g/L (LB Agar- Sigma) com ampicilina (100mM), IPTG (0,5mM) e X-GAL (50mM) durante 18 horas a 37° C para o crescimento das colônias. Em função do método de seleção colorimétrico, as colônias que apresentaram cor branca foram transferidas para o meio líquido para crescimento, contendo 1 mL de meio de cultura 20g/L (LB Broth - Sigma) e 100mM de ampicilina e mantidas durante 18 horas a 37° C em agitação constante (140 rpm).

A purificação do DNA plasmidial foi realizada a partir de 1,5 mL do meio líquido contendo as colônias, com o kit Plasmid Mini (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e 2µL do material purificado foi quantificado por espectrofotometria conforme descrito anteriormente. Amostras de 700 µL de meio líquido (LB Broth - Sigma) com bactérias contendo 300 µL de glicerol, foram estocados a -80° C, para preservação deste material para ISH.

Foi realizada ainda a digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição ECORI (Invitrogen) para confirmação do tamanho esperado do fragmento nas seguintes condições: 2 μ L do tampão ECORI (10x); 1 μ g da enzima ECORI (50mM); 1 μ g de RNase A; 2 μ L de DNA plasmidial purificado (50 ng/ μ L) e 14 μ L de água para biologia molecular, totalizando um volume final de 20 μ L por reação.

Os sequenciamentos dos fragmentos obtidos com os iniciadores específicos foram realizados no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da UFSC. A reação de amplificação dos fragmentos contidos nos plasmídeos foi realizada utilizando-se o kit ABI BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram primeiramente submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa ABI Sequencing Analysis Software v5.3.1 (Applied Biosystems) e posteriormente agrupadas pelo programa CAP3 (Sequence Assembly Program) (HUANG, MADAN, 1999), formando sequências consenso.

Após o sequenciamento do produto das clonagens, a sequência formada foi então comparada com a sequência esperada, utilizando o programa para edição de sequências BioEdit (Ibis Biosciences).

Posteriormente, os plasmídeos foram linearizados com as enzimas de restrição (ECORV e BAMHI) específicas aos seus promotores SP6 e T7 seguindo as instruções do fabricante, e precipitadas através do kit QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen), a fim de obter uma alta qualidade de DNA para a síntese de ambas as sondas *sense* e *antisense* pela transcrição *in vitro*.

3.5.6 Preparação da sonda de RNA (Transcrição *in vitro*)

As ribosondas *sense* (negativo) e *antisense* (positivo) utilizadas no Dot Blot e na hibridização *in situ* foram transcritas *in vitro* e marcadas não radioativamente com digoxigenina (DIG), com base no procedimento descrito por Barroso-Chinea e colaboradores (2007), com algumas modificações.

Como *template* foi utilizado um plasmídeo recombinante contendo o produto de 672pb proveniente da PCR. O fragmento foi clonado no plasmídeo TOPO® TA Cloning ®kit Dual Promoter, no qual o inserto foi ligado ao vetor do kit (pCRtm II – Topo® vector) conforme as instruções do fabricante. O primeiro passo foi linearizar os

plasmídeos e transcrevê-los com RNA polimerases apropriadas para sintetizar as ribosondas *sense* e *antisense*. Os 120 µl da transcrição *in vitro* incluem 6µg de *template* de cDNA plasmidial linear, 0,5 mM de rATP, rCTP, rGTP, 0,325 mM de rUTP, 0,175 mM de DIG rUTP (Roche), 0,1 M de DTT, 120 U de RNase inibitor (Promega) e 114 U de T7 ou SP6 RNA polimerase (Promega). Depois de sintetizar durante 2 horas a 37°C, o *template* de cDNA foi digerido com 6U RNase free DNase (Promega) por 15 minutos a 37°C. Em seguida, as ribosondas foram precipitadas com adição de cloreto de lítio 4M, etanol 100% e tampão 10mM de Tris e 1mM de EDTA e recuperadas por centrifugação a 4°C por 30 minutos. A qualidade da síntese da sonda e do anticorpo anti-DIG conjugado a fosfatase alcalina (Roche) foi monitorada pela técnica de Dot blot.

3.5.7 Dot Blot

A técnica de *Dot Blot* foi realizada com base no procedimento descrito por MÜLLER (2004). Amostras de RNA extraídas de ostras *C. brasiliiana* foram desnaturadas por 10 minutos a 65°C e então imobilizadas (6µl) em membrana de nitrocelulose sob vácuo, utilizando-se o sistema Hybri-Slot Manifold (Life Technologies). Posteriormente à aplicação das amostras, a membrana foi lavada com NaOH 0,4 M e SSC 10X. Após incubação a 80°C por 2 horas em solução de pré-hibridização (SSC 10X, reagente de bloqueio 1%, SLS 0,1%, SDS 0,2%), a membrana foi incubada durante a 65°C com a sonda marcada com DIG, previamente desnaturada.

A membrana foi lavada, sucessivamente, com tampão 1 (SSC 2X, SDS 0,1%), tampão 2 (SSC 0,5X, SDS 0,1%) e tampão 3 (ácido maléico 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,3%) e, então, foi incubada em solução de bloqueio 1X (Roche) por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). A imunodeteção foi realizada com anticorpo anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina (Roche), diluído em solução de bloqueio 1:500, por incubação com a membrana por 30 min (TA). Após ter sido mantida em tampão de lavagem 3 por 30 min, a membrana permaneceu submersa em tampão de detecção (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5) por 5 minutos. A detecção foi realizada incubando-se a membrana com NBT/BCIP (Roche) em tampão de detecção no escuro por até 1 hora.

3.5.8 Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* foi realizada com base no protocolo abcam®. Para esta técnica, foi utilizada ribossonda marcada com digoxigenina e testada previamente por Dot Blot.

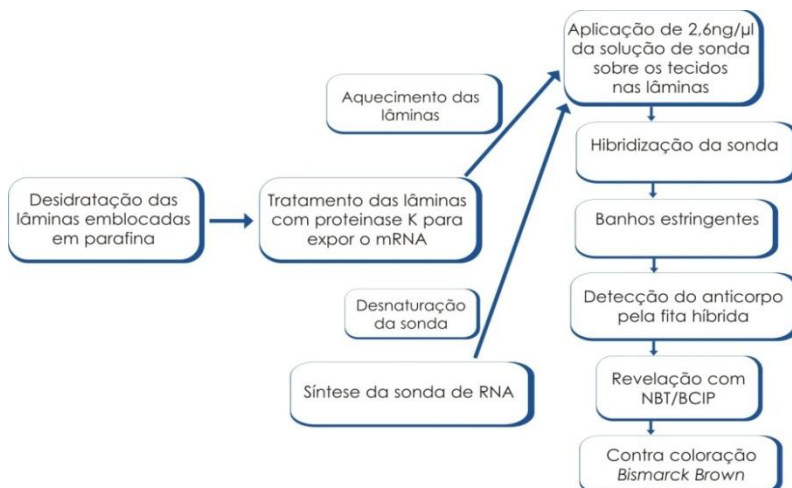


Figura 6: Etapas da técnica de ISH para localização do *CYP2A1* na ostra *Crassostrea brasiliana* (Adaptado do protocolo Abcam®).

Resumidamente, após desparafinização e hidratação, as lâminas foram digeridas com 20 µg/ml de proteinase K (Promega) pré-aquecidas incubando-as a 37°C por 10 min. A pré-hibridização foi realizada com as lâminas incubadas por 1 hora a 65°C em solução de pré-hibridização na câmara úmida. A hibridização ocorreu quando o tecido desnaturado foi coberto com a sonda *sense* ou *antisense* (2,6 ng/µl) marcada com DIG, também desnaturada (65°C por 30 min) e as lâminas incubadas durante a noite a 65°C. As lâminas foram lavadas em banhos pós-hibridização a 45°C de acordo com o protocolo.

Posteriormente, as lâminas foram bloqueadas em solução de bloqueio (MABT, 1% de *blocking reagent* (Roche), 2% ABS) por 1 hora a temperatura ambiente na câmara úmida. A imunodeteção foi realizada com anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (Roche), diluído em solução de bloqueio (1:500). Após incubação de 2 horas, em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em tampão de

lavagem MABT e incubadas no escuro a 37°C com a solução de revelação NBT/BCIP (Roche). A reação foi interrompida pela incubação das lâminas com PBS (durante a noite a 4°C). Ao final, os cortes foram contra corados com *Bismarck Brown Y* 0,5%, desidratados e as lâminas montadas com lamínula e meio de montagem *ERV-MOUNT* (Easy Path). A hibridização com as ribossondas *sense* foram utilizadas como controle negativo.

Os resultados da presença da isoforma *CYP2AUI* nos diferentes tecidos das ostras expostas por 10 dias a fenantreno e controle, foram semi-quantificadas de acordo com o método de avaliação de ISH proposto por HENKE e colaboradores (2006), onde o grau da coloração foi classificado como de baixa (+), média (++) e alta (+++) intensidade.

3.6 Análises químicas das ostras *C. brasiliana*

Para avaliar os níveis de bioacumulação de fenantreno nas ostras, o mesmo número amostral (72 ostras) remanescente (análises histopatológicas) foi utilizado para a análise química. Foram coletados *pools* dos tecidos (50g) restantes da dissecação histológica de cada tratamento (T1, T2 e CT), nos três tempos de exposição (1, 5 e 10 dias) e imediatamente congelados para a análise química.

Posteriormente, os tecidos respectivos a cada tratamento e período de coleta foram secos, extraídos e submetidos a um cromatógrafo a gás e posteriormente quantificados seguindo o procedimento metodológico baseado em Macleod e colaboradores (1986) no Laboratório de Química Orgânica Marinha (IO-USP).

3.7 Análise dos dados

Para a aplicação dos testes estatísticos adequados, os dados foram avaliados quanto a sua normalidade (teste de D'Agostino & Pearsons) e homocedasticidade (Teste de Levene). A distribuição foi considerada normal ou homocedástica para $p > 0,05$. Aqueles que apresentaram distribuição normal e foram homoscedásticos foram avaliados por meio de testes paramétricos. Aqueles que não apresentaram normalidade foram analisados por testes não-paramétricos. Os resultados da quantificação do percentual das células mucosas no manto foram transformados na função arco-seno (FOWLER; COHEN, 1998) e verificados quanto à presença de valores discrepantes (outliers)

através do Teste de Grubbs, sendo, então, excluídos das análises estatísticas.

As análises estatísticas dos dados foram realizadas mediante Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey e para dados não-paramétricos Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn's. As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica 6.1. e GraphPad Prism 5. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise química das ostras

Os níveis de fenantreno, dos *pools* de tecidos de ostras *C. brasiliiana* tratadas e controles, apresentaram valores acima do limite de detecção. Para isso, as amostras foram diluídas 100 vezes para que os níveis de concentração pudessem ser calculados como ilustrado na tabela 2.

Tabela 2: Níveis de bioacumulação de fenantreno de *pools* de ostras *C. brasiliiana* (n= 72) expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno e grupo controle (sem adição de fenantreno) coletadas após 1, 5 e 10 dias de exposição. Valores expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco.

Período	Tratamentos		
	CT	T1	T2
1 dia	56,77	67,33	117,18
5 dias	35,69	111,94	412,60
10 dias	47,12	237,70	872,16

Legenda: CT- Controle; T1 – Ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$; T2 – Ostras expostas a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$

De acordo com a tabela acima, observamos que os níveis de bioacumulação ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) de fenantreno nas ostras aumentou com o passar do tempo de exposição nas duas concentrações testadas.

Após 10 dias no laboratório, o grupo controle (CT), apresentou níveis de concentração de fenantreno de 47,12 $\mu\text{g.g}^{-1}$. É importante salientar que os níveis de fenantreno nos *pools* de ostras coletadas do ambiente de cultivo (tempo zero) apresentaram uma concentração basal de 43,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Níveis elevados de fenantreno foram observados nos animais expostos por 10 dias às duas concentrações, atingindo 237,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em T1 e 872,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em T2. É importante ressaltar que o fenantreno foi introduzido nos aquários diariamente, de acordo com o tratamento determinado.

4.2 Alterações histopatológicas

Neste estudo não foi observada mortalidade das ostras durante todo o experimento. A análise por microscopia de luz nas brânquias, intestino e estômago (Figura 7) não evidenciou alteração ou anormalidade nas estruturas das ostras controle e expostas nos três períodos de exposição.

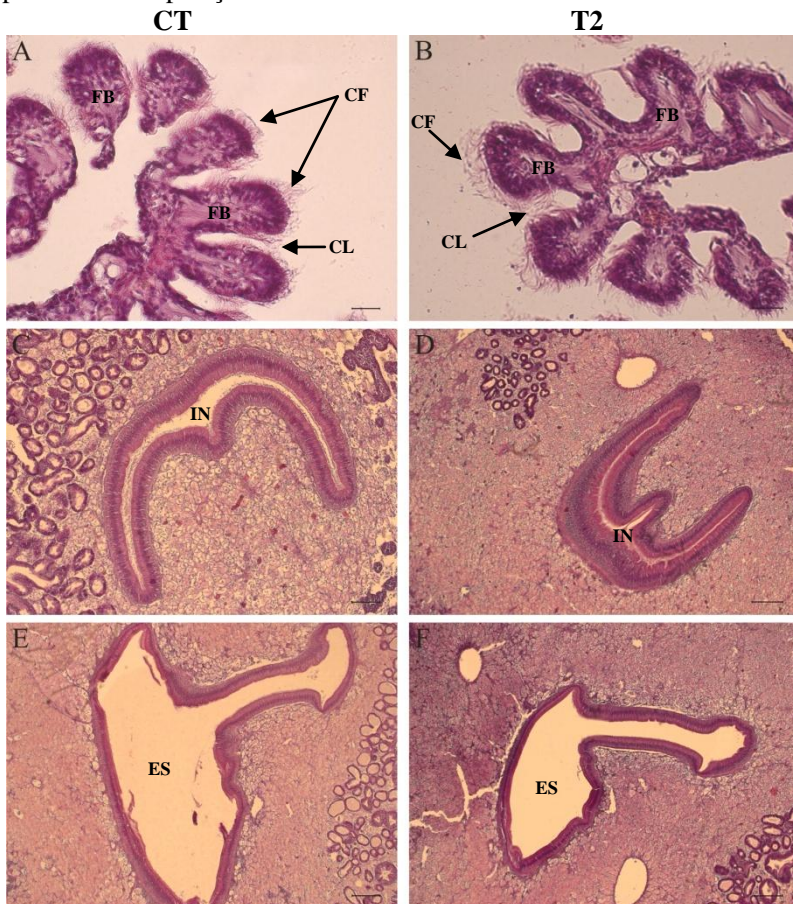


Figura 7: Corte transversal de brânquias, intestino e estômago da ostra *Crassostrea brasiliana* do grupo controle (CT) e expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenanteno (T2) por 10 dias. A-B) Lamelas branquiais íntegras onde aparecem detalhes dos diversos filamentos branquiais (FB) observa-se a presença de cílios laterais (CL) e frontais (CF); C-D) Intestino normal (IN), sem nenhuma presença de vacuolização ou desestruturação epitelial; E-F) Estômago normal (ES), sem nenhuma alteração do epitélio gástrico. Barras: (A, B); 20 μm (C,D,E,F) e 200 μm (b).

Entretanto, na glândula digestiva dos moluscos, principal centro de regulação metabólica, com o passar do tempo de exposição os animais apresentaram maior intensidade de atrofia na glândula digestiva (Figura 8). Não foram observadas alterações relacionadas à hipertrofia, hiperplasia e presença de vacúolos digestivos. Além disso, foi detectada qualitativamente a presença de lesões inflamatórias no tecido conjuntivo no entorno da glândula digestiva nos tecidos das ostras tratadas e controle desde o primeiro dia de exposição, com maior intensidade com 10 dias. Essas lesões foram observadas como sendo a presença de focos de células marrons (Figura 8 D).

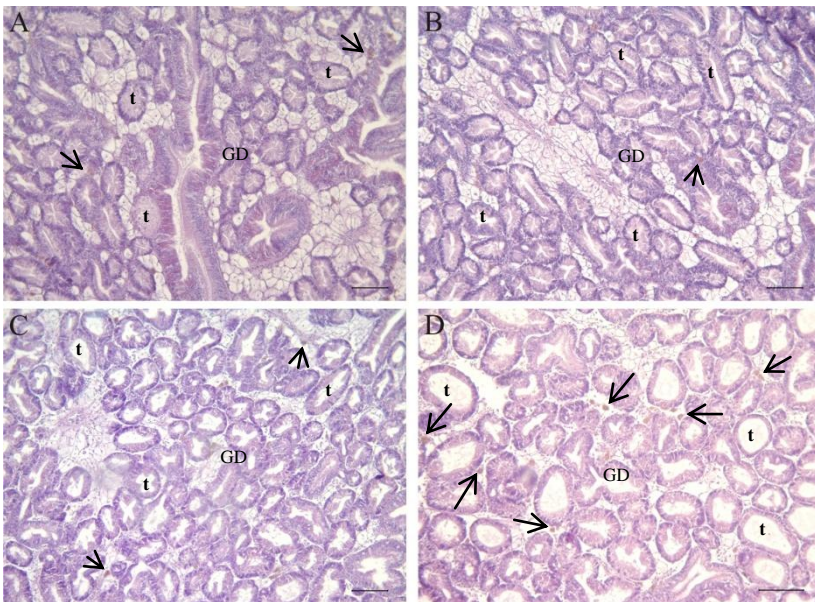


Figura 8: Corte transversal da ostra *Crassostrea brasiliana* expostas a 10 dias a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1) e grupo controle (CT), mostrando a atrofia dos (t) túbulos das glândulas digestivas. A) Glândula digestiva de ostras grupo controle (CT), presença moderada de atrofia (\pm), poucos túbulos atrofiados; B) Glândula digestiva de ostras grupo controle (CT), atrofia presente (+); C) Glândula digestiva de ostras expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1), atrofia muito presente (++); D) Glândula digestiva de ostras expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1), forte presença de atrofia (+++), parede extremamente fina. Setas indicam células marrons. Barra: $100 \mu\text{m}$.

Tabela 3: Marcadores histopatológicos para análise estrutural de glândula digestiva de ostras *Crassostrea brasiliana*, segundo Ellis e colaboradores (1998).

Período	Tratamentos	Marcadores histopatológicos			
		Hiperplasia	Hipertrofia	Atrofia	Vacuolização
1 dia	CT	-	-	+	-
	T1	-	-	±	-
	T2	-	-	±	-
5 dias	CT	-	-	++	-
	T1	-	-	++	-
	T2	-	-	++	-
10 dias	CT	-	-	++	-
	T1	-	-	+++	-
	T2	-	-	++	-

Legenda: CT- Controle; T1 – Ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$; T2- Expostas a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$; Marcador, (+++) fortemente presente, ++ muito presente; + Presente; ± pouco presente; - Ausente.

Na tabela 3 observa-se que a intensidade da atrofia tubular no grupo controle (CT) nos diferentes tempos aumentou em uma ordem de magnitude entre 1 (+) e 10 dias (++) , enquanto que a intensidade da atrofia de ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1) nos diferentes tempos aumentou em três ordens de magnitude entre 1 (±) e 10 dias (+++) e nas ostras expostas a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2) aumentou em duas ordens de magnitude entre 1 (±) e 10 dias (++) .

Quando comparado os tratamentos apenas com 1 dia de exposição observa-se o mesmo padrão de atrofia tubular no tratamento T1 e T2 (±) exceto no grupo controle que apresentou ordem de magnitude maior (+). Quando comparado os tratamentos apenas com 5 dias de exposição observa-se um padrão de atrofia tubular (++) neste intervalo de tempo. Já nos tratamentos apenas com 10 dias de exposição observa-se a maior intensidade de atrofia (+++) nos animais expostos a uma concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno e os demais tratamentos (CT e T2) com diminuição em uma ordem de magnitude (++) (Tabela 3).

No manto das ostras dos grupos controle e expostos por 10 dias foi observada uma vacuolização no tecido epitelial. Utilizando técnicas histoquímicas foi possível quantificar numerosas células mucosas (Figura 9).

A Figura 10 mostra o aumento no percentual de células mucosas no manto com o passar do tempo de exposição. Após 10 dias

de exposição, as ostras expostas à maior concentração de fenantreno mostraram diferenças significativas em relação ao controle.

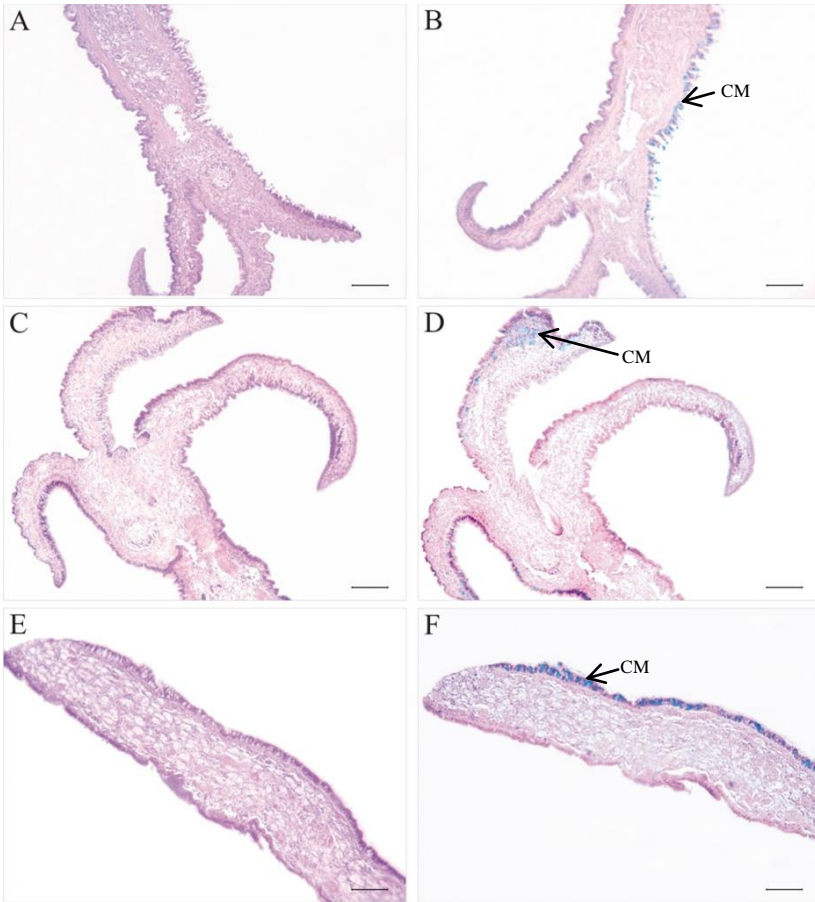


Figura 6: Corte transversal do manto de ostras *Crassostrea brasiliana* controle e expostas a fenantreno durante 10 dias. A) Presença de vacúolos no tecido epitelial do manto de ostras do grupo controle; B) Detalhe (azul) da presença de células mucosas (CM) nos vacúolos do manto de ostra do grupo controle; C) Presença de vacúolos no tecido epitelial do manto de ostras expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno; D) Detalhe (azul) da presença de células mucosas (CM) nos vacúolos do manto de ostra expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno; E) Presença de vacúolos no tecido epitelial do manto de ostras expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (F) Detalhe (azul) da presença de células mucosas (CM) nos vacúolos do manto de ostra expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Fotos: A, C e E coloração com HHE e fotos B, D e F coloração com Alcian blue. Barra: 100 μm .

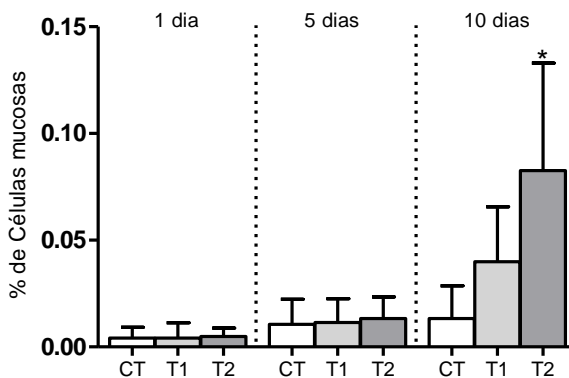


Figura 7: Percentual de células mucosas no manto de ostras *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno e grupo controle (sem adição de fenantreno) e coletadas em 1, 5 e 10 dias. CT) Controle; T1) Ostras expostas a fenantreno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$; T2) Ostras expostas a fenantreno 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. *Indica diferenças significativas entre tratamentos em relação ao controle $P < 0,05$.

Através da análise histológica foi observada uma proporção de sexos (macho: fêmea) de 1,8:1 no primeiro dia, 5,3:1 em cinco dias e 0,8:1 no décimo dia de exposição ao fenantreno. Em treze ostras não foi possível determinar o sexo devido ao estágio de repouso/indeterminado. Nenhum caso de hermafroditismo foi observado.

Tabela 4: Distribuição do número de animais ($n=72$) ao longo dos 10 dias de exposição ao fenantreno, identificação sexual e seus respectivos estádios reprodutivos. Legenda: (M) Macho; (F) Fêmea; (IN) Indeterminado/Repouso; (I) Gametogênese; (II) Pré-Desova; (III) Desova Parcial; (IV) Desova Total; (CT) Controle, (T1) 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, (T2) 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

	1 dias						5 dias						10 dias																				
	M		F		IN		M		F		IN		M		F		IN																
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV													
CT	1	1	-	3	1	-	-	2	-	-	-	-	5	1	-	-	1	-	-	-	1	2	1	-	2	1	-	-	-	-	-	2	3
T1	-	3	-	2	2	-	-	1	-	-	-	-	4	-	1	-	1	-	-	-	2	1	-	-	1	1	-	4	1	-	-	-	
T2	-	2	-	3	-	-	1	1	1	1	2	1	1	-	-	-	2	3	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	3	-	-	3	

A Tabela 4 mostra a distribuição do número de animais, identificação sexual e estádios de desenvolvimento gonádico nos três períodos de coleta. No primeiro dia de coleta foi observada uma maior predominância de machos em maior grau de maturação sexual (II), enquanto que os animais analisados do grupo exposto por 10 dias estavam em estágios iniciais de desenvolvimento reprodutivo (I). No segundo período de coleta, após 5 dias de exposição, houve uma predominância de animais machos em estágios iniciais de gametogênese (I) nos grupos CT e T1, enquanto que no grupo T2 foram observados indivíduos em todos os estádios de desenvolvimento. Os animais analisados após 10 dias de exposição apresentaram uma maior proporção de machos em estádios de gametogênese nos grupos CT e T2 e fêmeas em estádios de desova nos grupos CT e T1. O grupo T2 apresentou uma predominância de machos em gametogênese.

4.3 Dot Blot

Após a preparação da sonda, foi utilizada a técnica de *Dot Blot* para testar a especificidade e marcação das sondas *sense*, *antisense* e controle (apenas RNA de ostras *C. brasiliana*). As sondas *sense* e *antisense* reagiram revelando coloração azul arroxeado. O controle (sem sonda) apenas com RNA de ostras *C. brasiliana* não foi reagente. Após confirmação de eficiência das sondas *sense* e *antisense*, foi realizada a análise da sensibilidade da hibridização pela técnica de blotting. A hibridização com a sonda foi testada seguindo o procedimento descrito por Müller (2004). Foi observada a hibridização da sonda *antisense* (positivo) com o RNA de *C. brasiliana* e a ausência de hibridização com a sonda *sense* (negativo) (Figura 11).

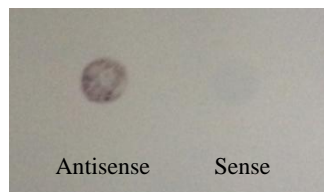


Figura 8: *Dot Blot* para hibridização da sonda antisense (positivo) com o RNA de *Crassostrea brasiliana* e a ausência de hibridização com a sonda sense (negativo).

4.4 Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* (ISH) foi realizada em lâminas (cortes de parafina) com sonda de RNA marcada não radiotivamente como já descrito anteriormente, de acordo com as seguintes etapas (Figura 11). Foram testados diferentes tempos de incubação e de concentração com proteinase K nas lâminas, até se obter a permeabilização dos tecidos sem alteração de sua morfologia. A técnica de ISH foi otimizada alterando o tempo, temperatura das lavagens (45°C) e a concentração de sal.

A aplicação da técnica de ISH caracterizou os principais sítios de transcrição do gene *CYP2AUI*, em diferentes tecidos de *C.brasiliana* expostas ao fenantreno e controle após 10 dias de exposição.

As lâminas contendo a sonda *sense* (controle negativo da técnica) não reagiram com a solução de revelação (Figura 11). As lâminas contendo a sonda complementar (*antisense*) ao RNAm revelaram coloração azul/arroxeadada em determinados órgãos (Figura 13,14,15).

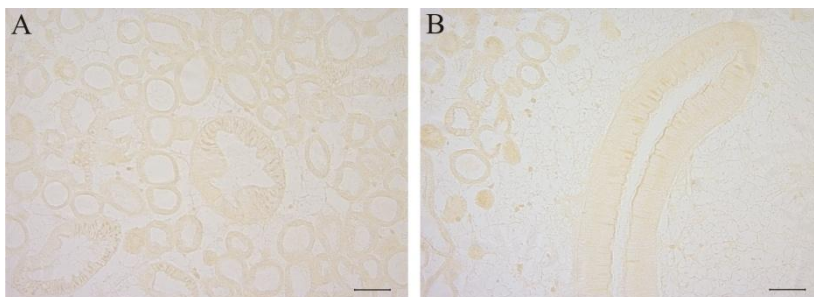


Figura 9: Lâminas da ostra *Crassostrea brasiliana* contendo a sonda *sense* (controle negativo da técnica) contra o RNAm, sem a detecção do sinal (azul/arroxeadado) em ostras do grupo controle (A) e exposto a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno (B). Barra: 100 µm (A, B, D, E, F, G, H) e 20 µm (C).

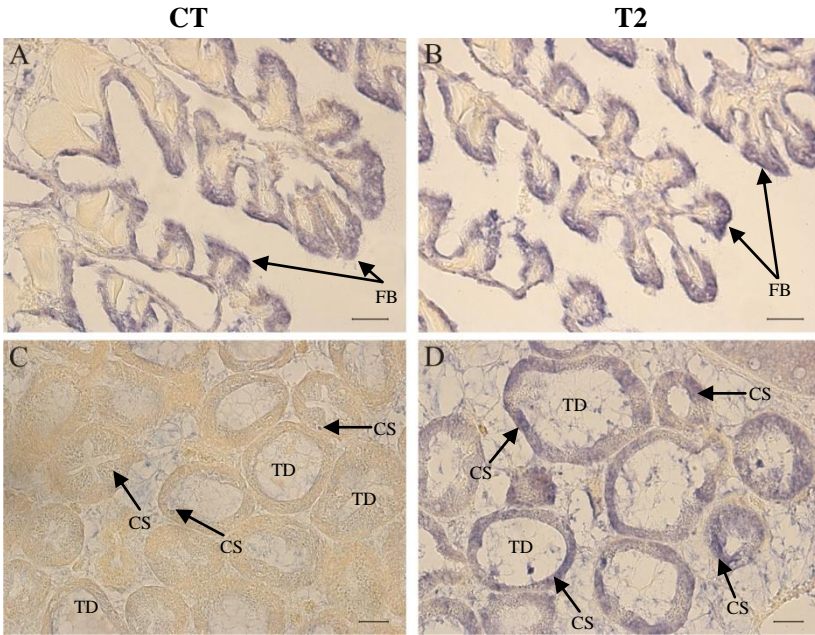


Figura 13: Localização dos transcritos do *CYP2A1* nas brânquias e glândula digestiva da ostra *Crassostrea brasiliana* do grupo controle (CT) e expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2) por 10 dias, hibridizadas com sonda antisense. A-B) Reação positiva nos filamentos branquiais (FB), sendo detectado o sinal (azul/arroxeadado) localizando os transcritos do *CYP2A1* no epitélio branquial; C-D) Na glândula digestiva, observa-se a marcação específica (azul/arroxeadado) nas células secretoras (CS) dos túbulos digestivos (TD). Barra: $100 \mu\text{m}$ (A-D).

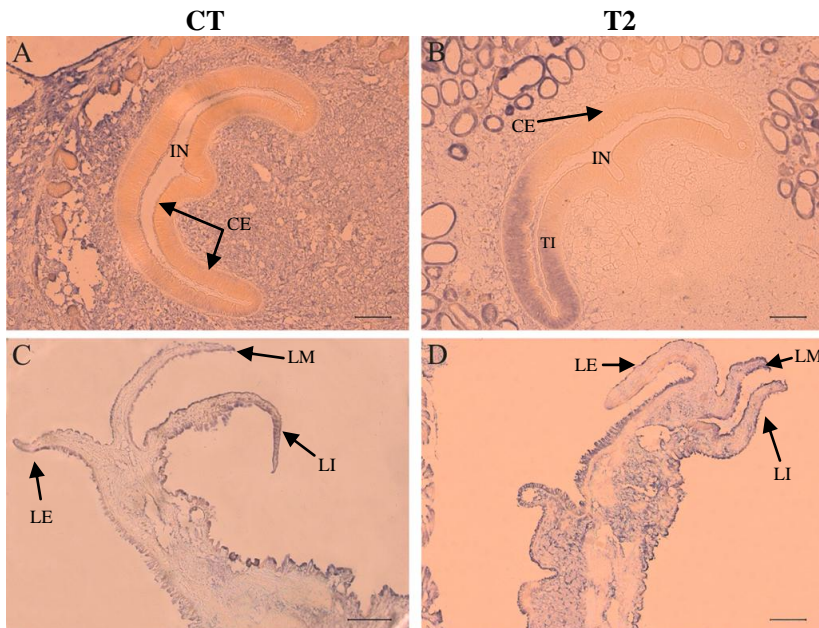


Figura 14: Localização dos transcritos do *CYP2AUI* no intestino e manto da ostra *Crassostrea brasiliana* do grupo controle (CT) e expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2) por 10 dias, hibridizadas com sonda *antisense*. A-B No intestino (IN), observa-se a marcação específica (azul/arroxeadado) nas células epiteliais (CE) e no túbulo intestinal (TI); C-D No manto, sinais (azul/arroxeadado) foram detectados a partir de células epiteliais do lobo interno (LI) e também do lobo médio (LM) com diminuição do sinal no lobo exterior (LE). Barra: $100\mu\text{m}$ (A- D).

Desde o primeiro dia de exposição/coleta as ostras apresentaram reação positiva (azul/arroxeadada) para a localização do *CYP2AUI* na brânquia, glândula digestiva, intestino, manto e gônadas.

Na tabela 5 observa-se um padrão de reação positiva na brânquia, manto e intestino. Nesses órgãos a intensidade de reação positiva de ostras do grupo controle permaneceu constantemente baixo (+) nos diferentes tempos de exposição.

Na brânquia observa-se que ostras expostas ao fenantreno (T1 e T2) apresentaram maior intensidade de reação positiva (++,+++) que as ostras do grupo controle (+) nos diferentes tempos de exposição. No manto ostras expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2) apresentaram maior intensidade de reação positiva (++) quando comparado ao grupo controle (CT) e exposição a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1). Já no intestino, a partir do quinto dia de exposição observa-se que as ostras

expostas ao fenantreno (T1 e T2) apresentaram maior intensidade de reação positiva (++) que as ostras do grupo controle (+) (Tabela 5).

A glândula digestiva e as gônadas das ostras foram órgãos que não apresentaram o mesmo padrão de intensidade de sinal. O grupo controle apresentou um aumento na intensidade de reação positiva ao longo dos dias de exposição (Tabela 5).

Após 5 dias de tratamento, foi observada uma alta intensidade de reação (+++) na glândula digestiva de ostras expostas a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2). Entretanto, ostras do grupo controle (CT) apresentaram aumento no sinal de reação (++) após 5 e 10 dias de exposição. Também foi observado aumento de sinal de reação nos grupos T1 e T2 após 5 e 10 dias de exposição (Tabela 5).

Nas gônadas foi observada a localização de transcritos do *CYP2AUI* com alta intensidade de reação (azul/arroxado) positiva nas gônadas de machos e fêmeas a partir do quinto dia de exposição. A intensidade do sinal do grupo T1 foi maior nos tempos de exposição de 5 e 10 dias quando comparados ao tempo de 1 dia. O grupo T2 apresentou maior intensidade do sinal no tempo de 5 dias em relação ao tempo de 1 dia (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação semi-quantitativa de ISH (sonda *antisense*), com sinal positivo (azul/arroxado), segundo método adotado por Henke e colaboradores (2006).

Período	Tratamentos	Órgãos analisados				
		BR	MA	IN	GD	GO
1 dia	CT	+	+	+	+	+
	T1	++	+	+	+	+
	T2	++	++	+	+	+
5 dias	CT	+	+	+	++	++
	T1	++	+	++	++	+++
	T2	+++	++	++	+++	++
10 dias	CT	+	+	+	++	+++
	T1	+++	+	+	+++	++
	T2	+++	++	++	+++	+

Legenda: CT- Controle; T1 – Ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$; T2- Expostas a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$; BR- Brânquia; GD- Glândula Digestiva; GO- Gônada; MA- Manto; IN- Intestino, (-) sem sinal, (+) 20% das células com sinal positivo baixo, (++) 50% das células com sinal positivo médio, restante em (+), (+++) mais de 50% das células com alto sinal, restante em (++)

Foi possível observar reação positiva desde estádios iniciais (gametogênese) até a maturação avançada nas gônadas femininas e também nos machos em estágio inicial de desenvolvimento (gametogênese). Entretanto, nas gônadas masculinas em estágio de maturação mais avançado (pré-desova) apenas as células da parede dos ácinos apresentaram reação positiva do *CYP2AUI* (Figura 13).

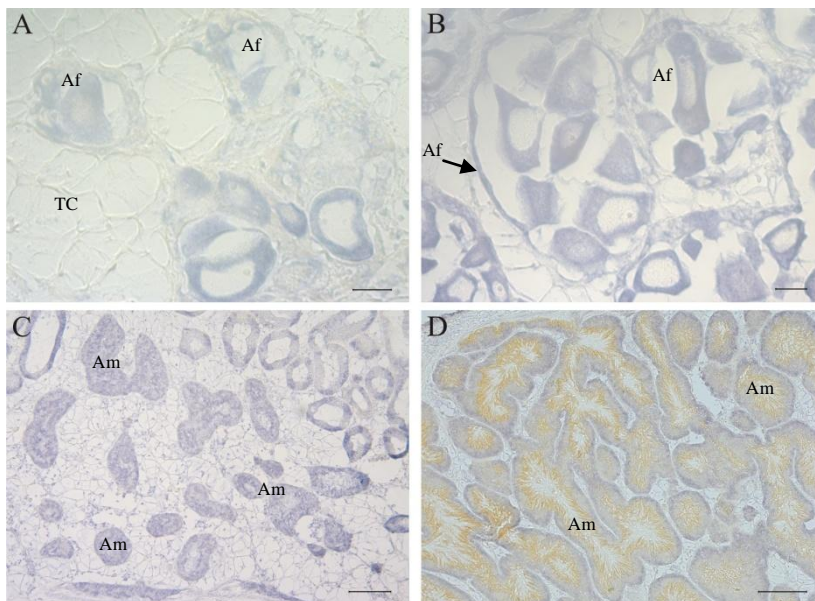


Figura 10: Localização do *CYP2AUI* nas gônadas da ostra *Crassostrea brasiliana* expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 5 dias. (A-D) Ostras hibridizadas com sonda antisense. A) Reação positiva, sendo detectado o sinal (azul/arroxeadado) da localização do *CYP2AUI* nos ácinos das gônadas femininas (Af) em estágio de gametogênese com grande quantidade de tecido conjuntivo (TC); B) Gônada feminina em pré-desova observa-se o estágio de maturação mais avançada dos ácinos femininos (Af); C) Gônadas masculinas em estágio de gametogênese, onde se observa a reação positiva (azul/arroxeadado) nos ácinos das gônadas masculinas (Am); D) Estádio avançado de desenvolvimento (pré-desova) apenas no epitélio dos ácinos masculinos (Am). Barra: 20 μm (A,B) e 100 μm (C,D).

5. DISCUSSÃO

Alterações nas condições ambientais das áreas costeiras causadas por pressões antrópicas podem afetar várias atividades econômicas, entre elas a pesca e maricultura, o que reforça a necessidade da manutenção de ambientes saudáveis nas zonas costeiras e justifica a importância e necessidade da realização de trabalhos voltados para o biomonitoramento.

Para esta finalidade, alguns estudos realizados em nosso laboratório têm proposto a utilização de respostas bioquímicas e moleculares e a bioacumulação de diferentes contaminantes, como por exemplo, o fenantreno em moluscos bivalves (GOMES, 2013; FLORES-NUNES, 2013; LÜCHMANN et al., 2014).

O fenantreno é um dos principais componentes do petróleo bruto, amplamente distribuído no meio aquático, e é considerado um composto bastante tóxico aos invertebrados marinhos, pois exibe um amplo fator de bioacumulação em organismos aquáticos (FIGUEIREDO, 1999; HANNAM et al., 2010; OLIVEIRA et al, 2007). Albers (2005) explica que os moluscos bivalves, por não possuírem sistemas de detoxificação desenvolvidos, tendem a bioacumular esses compostos mais intensamente. Anyakora e colaboradores (2005) confirmaram a presença de altas concentrações de fenantreno ($1.460 \mu\text{g.L}^{-1}$) na água do mar, em áreas de descarga de óleo na Nigéria.

É sabido que os bivalves filtradores podem acumular contaminantes nos seus tecidos em concentrações de 1.000 a 10.000 vezes superior às verificadas na fonte de exposição (UNEP, 2004). Isso pode explicar porque em nosso estudo, os níveis de fenantreno encontrados nos tecidos de *C. brasiliiana* foram de $237,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ em ostras expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1), e também como detectado na exposição de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (T2), em que a concentração de fenantreno chegou a $872,2 \mu\text{g.g}^{-1}$, após 10 dias de exposição ao contaminante.

Estudos demonstraram diferentes níveis de bioacumulação de fenantreno em bivalves (HANNAM et al., 2010; MOORE et al., 1984; SCHÄFER et al., 2011; WOOTTON et al., 2003) e essa diferenciação pode estar associada a interação de alguns fatores como diferentes concentrações de exposição que os animais foram submetidos; o tempo de exposição; e a capacidade de cada espécie de metabolizar o contaminante (WEINSTEIN, 1997; WIDDOWS; DONKIN, 1992; WOOTTON et al., 2003).

Em nosso estudo, após 10 dias de exposição ao fenantreno, foi observado que ostras do grupo controle (CT) possuíam $47,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de fenantreno, resultado próximo ao nível de concentração de $43,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, observado nas ostras coletadas do cultivo, no início do experimento.

Parte das fazendas de cultivo de Santa Catarina está ameaçada, pois estão localizadas em baías que recebem influência de efluentes de rios, águas pluviais de vias de tráfego e esgoto clandestino, reconhecidas fontes poluidoras (FLORES-NUNES, 2008).

Diversos estudos relatam diferentes concentrações de HPA acumulados (peso seco) nos tecidos de moluscos bivalves coletados próximos a costa (FLORES-NUNES, 2008; KRISHNAKUMAR et al., 1995; PICCARDO et al., 2001; YOSHIMINE et al., 2012). A capacidade limitada de moluscos bivalves de metabolizar HPAs resulta muitas vezes, em uma alta acumulação desses hidrocarbonetos nos tecidos (HANNAM et al., 2010).

Contudo existe uma carência de estudos que comprovem que o acúmulo de HPAs possa causar danos histopatológicos que comprometam a saúde das ostras (EERTMAN et al., 1995; FASULO et al., 2008; MOORE et al., 1964; WEINSTEIN, 1997). Por isso, a identificação de possíveis alterações teciduais decorrentes da exposição a fenantreno torna-se importante.

5.1 Análises Histopatológicas

Sabe-se que as brânquias estão em contato direto com os contaminantes presentes no meio aquático e, por isso, são a principal forma de incorporação destes elementos dissolvidos na água (VIARENGO, 1989). Por esse motivo, as brânquias destes animais foram estudadas para determinar possíveis diferenças entre as respostas agudas (e talvez sub-crônicas) nas duas concentrações de exposição ao fenantreno testadas.

Ainda que a brânquia seja um órgão com uma estrutura sensível ao estresse e aos contaminantes, o que permitiria observar facilmente os efeitos dos poluentes solúveis em água (GEORGE; PIRIE; COOMBS, 1976), no presente estudo as brânquias dos animais expostos nas duas concentrações de fenantreno e controle não apresentaram alterações ou anormalidades em sua estrutura (Figura 8A e 6B), nos três períodos de exposição (1, 5 e 10 dias). A hipótese é de que isto tenha ocorrido devido ao tempo ou a concentração de exposição, talvez insuficientes,

para causar danos a sua estrutura. No estudo de George e colaboradores (1976) a exposição foi de 25 dias. Outros estudos expuseram bivalves a concentrações de HPAs superiores (SUNILA, 1988, WANG et al., 2010), quando observaram alterações nas brânquias.

O estômago possui em sua estrutura interna sulcos ciliares, que desempenha importante função na triagem e absorção dos alimentos (HOLOPAINEM; LOPEZ, 1989). Em nosso estudo, o tempo e a concentração de exposição ao fenantreno pode ter sido insuficiente para causar alterações ou anormalidades na estrutura dos sulcos ciliares, uma disfunção nessa estrutura poderia ocasionar deficiência na digestão dos organismos.

No intestino dos bivalves, o material ingerido e não absorvido é eliminado na forma de fezes, através da região exalante, juntamente com uma pequena parcela de material originado das células e enzimas envolvidas no processo digestivo (HAWKINS; BAYNE, 1992; HOLOPAINEM; LOPEZ, 1989).

Assim como no estudo de Mix e Sparks (1970), o intestino das ostras tratadas e controle mantiveram sua arquitetura normal (nenhuma fragmentação, perda de cílios ou descamação), nos animais analisados nos três períodos de exposição. A hipótese de que isto tenha ocorrido é que diferente da brânquia e do manto, o intestino é um órgão que não possui o contato direto com a água contaminada, mas apenas, com o material ingerido pelas ostras.

A glândula digestiva dos moluscos apresentou um maior grau de atrofia tubular com o passar do tempo de exposição ao fenantreno nos diferentes grupos experimentais. A atrofia da glândula digestiva (divertículo digestivo), é uma condição caracterizada pelo adelgaçamento do lúmen e das paredes do túbulo digestivo, tem sido descrita em inúmeras espécies de bivalves (ELLIS et al; 1998).

Em nosso estudo, quando comparado os tratamentos apenas com 10 dias de exposição observou-se a maior intensidade de atrofia (+++) nos animais expostos a uma concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno e os demais tratamentos (CT e T2) com diminuição em uma ordem de magnitude (++) (Tabela 3). Este resultado sugere que o fenantreno pode estar interferindo, de forma sub-crônica, na atrofia tubular desses animais.

Quando comparado a intensidade da atrofia tubular no grupo controle (CT) nos diferentes tempos, observa-se um aumento em uma ordem de magnitude entre 1 (+) e 10 dias (++) , enquanto que a intensidade da atrofia de ostras expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T1)

nos diferentes tempos aumentou em três ordens de magnitude entre 1 (\pm) e 10 dias (+++) e nas ostras expostas a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (T2) aumentou em duas ordens de magnitude entre 1 (\pm) e 10 dias (++). Este resultado sugere que o fenantreno pode estar agindo de forma sinérgica com o estado nutricional das ostras aumentando a intensidade da atrofia (CARBALLEIRA et al., 2011; COUCH, 1984).

Segundo Carballeira e colaboradores (2011), a exposição aos poluentes pode causar danos às células da glândula digestiva. As causas desta condição têm sido atribuídas a uma variedade de estressores, incluindo a exposição aos poluentes. Entretanto, deve-se ter cautela nessa afirmação haja vista que as variações na oferta de alimentos também podem causar atrofia tubular (ELLIS et al., 1998).

Em nosso trabalho, a alimentação introduzida no aquário era diária e baseada na metodologia de dieta mista adotada por Ramos e colaboradores (2013). Muller-Feuga e colaboradores (2003) relatam que dietas mistas de microalgas aumentam as chances de se obter uma dieta equilibrada. Contudo, as microalgas utilizadas podem não ter atingido o valor nutricional necessário para suprir a necessidade energética da espécie.

O aparecimento da atrofia nos túbulos digestivos tem sido relacionado com a exposição a poluentes (COUCH, 1984). Segundo Zorita e colaboradores (2006), esta atrofia epitelial pode levar a uma reduzida capacidade de digerir material particulado (alimento). Portanto, a exposição a contaminantes pode causar a atrofia dos túbulos digestivos, fazendo com que os moluscos bivalves diminuam ou, até mesmo, deixem de se alimentar.

Weinstein (1997) observou que ostras (*Crassostrea virginica*) expostas por 21 dias a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fluoranteno em laboratório, também apresentaram uma redução no epitélio tubular. Estes trabalhos corroboram com o nosso estudo, tendo em vista que as ostras mantidas sob condições controladas de alimentação, temperatura e salinidade apresentaram em todos os tratamentos (T1, T2, CT) atrofia nos túbulos digestivos, desde o primeiro dia de exposição.

Além de atrofia tubular, foram detectadas células marrons no tecido conjuntivo, no entorno da glândula digestiva. Foi observada a presença de células marrons nos tecidos de ostras dos grupos T1 e T2 apenas com 10 dias de exposição, o que sugere uma reação sub-crônica ao contaminante. Há que se considerar, entretanto, que células marrons são características patognomônicas geradas por diversos fatores que, não apenas pela exposição ao fenantreno (BIGNEL et al., 2011).

Essas lesões são frequentemente observadas em organismos aquáticos, incluindo ostras provenientes de ambientes estressantes e são comumente associadas com a exposição a metais e xenobióticos orgânicos (BIGNEL et al., 2011). Após uma resposta inflamatória, parece que os agregados inflamatórios (células marrons), migram através do tecido conjuntivo para a membrana de um órgão alvo da ostra, para a remoção através da diapedese. Isto se evidenciou na observação dos agregados inflamatórios (células marrons) nas glândulas digestivas.

Quanto à superfície interior do manto, esta é composta principalmente por células ciliadas e células secretoras de muco (mucócitos), que se dedicam ao acúmulo e transporte dos rejeitos da sua cavidade (COAN et al., 2000). O muco secretado pela ostra participa na captação de alimento, sendo também uma via de incorporação de contaminantes (MARIGOMEZ et al., 2002).

Sabe-se que cada órgão dos bivalves pode bioacumular concentrações diferentes de contaminantes (DHEILLY et al., 2011). Moore e colaboradores (1984) observaram que após exposição a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ por 3 dias, mexilhões bioacumularam as maiores quantidades de fenantreno no manto ($23,7 \mu\text{g.L}^{-1}$) em relação aos demais órgãos analisados.

Até o momento, existe uma carência de estudos que relatam o potencial do manto como órgão-alvo de bioacumulação de contaminantes e, principalmente, ao fenantreno.

Observamos em nosso estudo que o percentual de células mucosas (mucócitos) no manto aumentou com o passar do tempo de exposição ao fenantreno (Figura 10). Após 10 dias, as ostras tratadas na maior concentração de fenantreno (T2) apresentaram um aumento significativo de células mucosas ($p < 0,05$) em relação ao controle. Concomitantemente, neste mesmo período, e com concentração (T2), os *pools* de ostras apresentaram os maiores valores de bioacumulação (peso seco) de fenantreno (Tabela 2). Estes resultados sugerem que, após 10 dias, a exposição das ostras à maior concentração de fenantreno (T2) pode ter influenciado no aumento do percentual de células mucosas no manto. Fasulo e colaboradores (2008) observaram um aumento de células mucosas (mucócitos) na brânquia de *Mytillus galloprovincialis* coletado em um ambiente poluído e, ainda consideraram que, a presença de mucócitos nestes órgãos representa um mecanismo de defesa da espécie a contaminantes.

Com relação à identificação sexual dos animais e ao estágio reprodutivo (Tabela 4), levamos em consideração nesse estudo a importância da determinação do sexo desses animais em programas de biomonitoramento ambiental. Tendo em vista que muitas vezes indivíduos da mesma espécie, mas de sexo opostos, diferem em relação à suscetibilidade ao estresse tóxico (HINES, 2007; SCHÄFER et al., 2011). Ostras do gênero *Crassostrea* possuem a capacidade de mudar de sexo, por serem hermafroditas assíncronas (não simultâneas), mudando sua fase sexual de macho para fêmea e de fêmea para macho, podendo apresentar-se como macho ativo e fêmea ativa a cada ano (GOSLING, 2004).

Assim, com relação à análise das gônadas, detectamos que havia uma maior proporção de machos do que fêmeas nos tratamentos durante o período amostral.

No caso dos machos expostos ao fenantreno T1 e T2, observamos que o estágio de maturação sexual, pré-desova, esteve presente no início do experimento (1dia), revertendo para estádios iniciais de desenvolvimento reprodutivo (gametogênese) ao final de 10 dias.

Estudos revelam que em invertebrados, gametas masculinos muitas vezes parecem ser mais suscetíveis a estresse químico (AU., et al, 2001;. CALDWELL et al, 2004.; FITZPATRICK et al., 2008). Assim, em nosso estudo o fenantreno pode ter causado uma regressão na maturação da gônada após o primeiro dia de exposição ao fenantreno. Em diferentes espécies de invertebrados, Caldwell e colaboradores (2004) observaram uma redução no sucesso de fertilização após a pré-incubação de espermatozoides com aldeído. Fitzpatrick e colaboradores (2008), observaram taxas de fertilização significativamente reduzidas do mexilhão *Mytilus trossulus*, após a exposição do esperma a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre. Existe uma carência de estudos que relatam à suscetibilidade das gônadas de invertebrados a exposição de fenantreno.

No caso das fêmeas expostas ao fenantreno obtivemos resultados opostos aos machos. Fêmeas expostas a T1, no primeiro e quinto dia o estágio era de gametogênese (I), no décimo dia, o estágio com maior prevalência foi o de desova total (IV). Na exposição T2, as fêmeas apresentaram estágio de desova parcial (III) e total (IV) no primeiro dia de exposição, revertendo para estágio de gametogênese (I) no quinto e décimo dia. De acordo com esses resultados, podemos inferir que as fêmeas também podem ter sofrido influência do fenantreno, visto que, as ostras expostas à menor concentração (T1)

podem ter sofrido aceleração na desova. E no grupo T2, o fenantreno pode ter causado a redução no volume de gametas.

Hidrocarbonetos são conhecidos por terem uma grande variedade de efeitos reprodutivos em bivalves, incluindo atrofia do epitélio germinativo, redução no volume de gametas e células de armazenamento, e aumento dos níveis de atresia no oócito (BARSZCZ et al, 1978;. LOWE; PIPE, 1985; LOWE, 1988). Eertman e colaboradores (1995) observaram a inibição no desenvolvimento gonádico em mexilhões (*M. edulis*) que bioacumularam níveis de fluoranteno de $7,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

5.2 Localização de transcritos do *CYP2AUI* nos tecidos de *C. brasiliiana*

Através de técnicas bioquímicas e moleculares, em estudos anteriores LÜCHMANN et al. (2014), observaram uma alta indução de transcritos gênicos de *CYP2AUI* em brânquias e glândulas digestivas de *C. brasiliiana* a partir da exposição desses animais a concentração de 100 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenantreno.

Tomando por base os resultados desse estudo, e tendo em vista que a técnica de ISH ainda não ter sido utilizada para localização de CYPs para esta espécie, através da técnica de ISH, observamos exatamente em quais células das brânquias e glândulas digestivas além de outros órgãos como as gônadas, manto e intestino estavam localizados os transcritos do *CYP2AUI*. Além disso, integramos técnicas histológicas, histoquímicas e análises químicas para elucidar os possíveis efeitos que o fenantreno pode causar nesses órgãos ao longo dos dias de exposição. As lâminas contendo a sonda *sense* (controle negativo da técnica) não reagiram com a solução de revelação.

Quanto à localização de transcritos do *CYP2AUI* nas brânquias, apesar de não terem sofrido nenhuma alteração na sua estrutura morfológica, observamos reação positiva (azul/arroxeadado) nas ostras do tratamento T1, T2 e CT, através da técnica de ISH. Através desta técnica, localizamos o gene e observamos que o sinal (azul/arroxeadado) no epitélio branquial foi mais intenso (+++) nos animais expostos na maior concentração de fenantreno (T2), a partir do quinto dia de exposição (Tabela 5). Foi observado também que, com o passar do tempo de exposição, houve um aumento da intensidade de reação do citocromo. Esses resultados foram confirmados através da análise química (Tabela 2).

Portanto, é possível inferir que, quanto maior os níveis de fenantreno bioacumulado nas ostras, maior é a intensidade de sinal do gene *CYP2AUI* nas brânquias. Lüchmann e colaboradores (2014) descobriram uma alta indução de transcritos gênicos de *CYP2AUI* na brânquia de *C. brasiliiana*, a partir da exposição desses animais a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno após 24h de exposição. Estes resultados corroboram com a localização deste gene pela técnica de ISH, confirmando que a presença do *CYP2AUI* nas brânquias é um possível indicador de que as células deste órgão respondem ao estresse induzido pela exposição de HPA em bivalves.

A borda do manto da *C. brasiliiana* é composta por três lobos: um mais interno, chamado de lobo palial, provido de tentáculos; um lobo médio, denominado sensorial, também recoberto por tentáculos; e o lobo externo, responsável pela formação da concha (EBLE; SCRO, 1996), sendo que o lobo interno (palial) no manto das ostras é o tecido que tem o primeiro contato com a água do ambiente (GALTSOFF, 1964).

Em nosso estudo, no que se refere à localização de transcritos do *CYP2AUI* no manto observamos, através da técnica de ISH, reação positiva (azul/arroxeadado) na localização do *CYP2AUI* nas células epiteliais do lobo interno e também no lobo médio, com uma leve diminuição do sinal no lobo exterior. Sinais de reação positiva também foram detectados nas bordas do manto, desde o primeiro dia de exposição, nas ostras expostas a T1, T2 e CT, com maior intensidade de reação (++) sendo observada em 10 dias de exposição (Tabela 5). Observamos que desde o primeiro dia de experimento que o lobo interno (palial) e médio (sensorial) obtiveram uma intensidade de reação moderada com diminuição do sinal no lobo exterior. Isso provavelmente se deve ao fato da estrutura e função desses tecidos serem diferenciadas. Os lobos médios e internos possuem sua estrutura recoberta por tentáculos (EBLE; SCRO, 1996) o que aumentaria a superfície de contato com a água contaminada. Além disso, o lobo interior é o tecido que têm os primeiros contatos com a água proveniente do ambiente e que entra na cavidade do manto (GALTSOFF, 1964).

Assim o manto, por possuir tecidos que estão em contato direto com os contaminantes presentes no meio aquático, deve ser considerado um órgão-alvo de localização de transcritos do *CYP2AUI*, principalmente nos lobos internos onde ocorreu maior intensidade de reação. Este resultado corrobora com o estudo de Okada e colaboradores (2013), que

detectaram em *C. gigas*, através de ISH, a localização de transcritos do gene *Cg-Chit1* nas células epiteliais do lobo interno do manto.

No caso do intestino, observamos que com o passar dos dias de exposição ao fenantreno, células epiteliais intestinais e do interior dos túbulos intestinais apresentaram reação positiva (++), principalmente nas ostras expostas a concentração de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Wang e colaboradores (2010) detectaram forte expressão de citocromo P450 nos túbulos renais e células epiteliais intestinais de peixes expostos a 5mg.L^{-1} de benzo(a)pireno. Diante desses resultados, a reação positiva na localização de transcritos de *CYP2AUI* nas células intestinais, podem ser um indicador de resposta ao estresse induzido pela exposição ao fenantreno em moluscos bivalves.

Quanto à localização de transcritos do *CYP2AUI* nas glândulas digestivas, através da técnica de ISH, desde o primeiro dia de exposição, a reação foi positiva (azul/arroxeadado) nas células secretoras dos túbulos digestivos das ostras do tratamento T1, T2 e CT. Entretanto, não se observa o mesmo padrão de reação positiva ao longo o tempo de exposição como os demais órgãos analisados.

Observamos sinal de alta (+++) intensidade de reação (azul/arroxeadado) nas células secretoras dos túbulos digestivos (Figura 13 D), em ostras expostas por 10 dias a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. A glândula digestiva de bivalves é constituída por uma série de túbulos que se comunicam com o estômago por uma sequência de dutos ramificados. O epitélio dos túbulos digestivos é composto por dois tipos de células, as principais que são as digestivas e as em menor proporção, as células secretoras ou basófilas (GOSLING, 2003; MORTON, 1983).

A alta intensidade de reação positiva nas células secretoras com o passar dos dias de exposição pode ser um indicador de resposta ao estresse induzido pela exposição ao fenantreno, já que estas células contribuem para a digestão extracelular e regulação metabólica (DIMITRIADIS et al., 2004; MARIGÓMEZ et al., 1995, 1998). Entretanto, a de se ter cautela nesta afirmação visto que ostras do grupo CT (sem adição de contaminante) apresentaram um alto sinal de reação (+++) com o passar dos dias de exposição. Esta condição pode estar relacionada com a atrofia tubular observada nos animais deste grupo (Tabela 3).

Esses resultados corroboram com o estudo de Lüchmann e colaboradores (2014), que encontraram a maior indução de transcritos gênicos do *CYP2AUI* na glândula digestiva de *C. brasiliiana*, após 24h de exposição desses animais a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno.

Foi observada a localização de transcritos do *CYP2AUI* com alta intensidade de reação (azul/arroxeadado) positiva nas gônadas de machos e fêmeas expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ a partir do quinto dia. Este aumento na intensidade de reação pode estar relacionado com os níveis de fenantreno bioacumulados pelas ostras, que foram crescentes com o passar do tempo de exposição.

Observamos que nos machos expostos no dia 1, a intensidade de reação positiva (azul/arroxeadado) foi menor, devido à localização de transcritos do *CYP2AUI* (reação positiva) terem ocorrido com maior prevalência, apenas no epitélio dos gonodutos de machos em estágio de pré-desova. No quinto e décimo dia, foi observado sinal de reação positiva com maior intensidade de reação, pois a reação positiva ocorreu em todas as células da gônada masculina no estágio de gametogênese.

Diante desses resultados a localização dos transcritos de *CYP2AUI* na gônada dos machos pode ter relação com estágio reprodutivo.

A espermatogênese (gametogênese) é um processo de diferenciação celular que conduz a formação dos gametas masculinos. Durante os estádios iniciais deste processo, as células precursoras se dividem mitoticamente inúmeras vezes até que finalmente sofrem divisões meióticas a partir do qual as células resultantes (espermátides) adquirem um genoma haploide e seguem diferenciando-se (espermiogênese) até produzir células altamente diferenciadas que correspondem aos espermatozoides maduros (FELPETO, 2001). A diminuição do sinal de reação nos indivíduos que estão em estádios de maturação mais avançada (Pré-desova) pode estar relacionada com a diminuição das espermátides.

No caso das fêmeas, observamos intensidade de reação positiva (azul/arroxeadado) nas gônadas em todas as fases da ovogênese (gametogênese). Demonstrando que a localização dos transcritos é independente do ciclo reprodutivo.

Com base nestes resultados podemos sugerir que a localização de transcritos do *CYP2AUI* nas gônadas de *C. brasiliiana* pode ter influência do sexo e estágio reprodutivo (espermatogênese) nos machos.

Este foi o primeiro estudo que utilizou a técnica de hibridização *in situ* para localização de transcritos de citocromo P450 (*CYP2AUI*) em moluscos bivalves, o que possibilita a geração de novos trabalhos com outras isoformas de P450, bem como outros genes de biotransformação.

Sugere-se a utilização da brânquia como órgão-alvo para estudos de biomonitoramento visto que apresentou uma maior variação

de magnitude no sinal do gene *CYP2AUI* em relação ao controle. Além disso, este tecido não apresentou danos histopatológicos o que poderia mascarar os resultados da transcrição gênica.

Contrariamente à brânquia, a glândula digestiva e o manto apresentaram alterações histopatológicas que podem dificultar as interpretações dos resultados. Adicionalmente, a gônada é um tecido de elevada complexidade devido às variações de maturação que podem afetar a transcrição do *CYP2AUI*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram uma significativa bioacumulação de fenantreno no tecido das ostras expostas, que foram associados a alguns efeitos histológicos observados na glândula digestiva e no manto de animais expostos. Interessantemente, nenhum dano histológico foi observado nas brânquias, intestino e estômago dos animais expostos.

Utilizando a técnica de ISH foi possível localizar os transcritos do *CYP2AUI* em diferentes órgãos da ostra *C. brasiliana*. A ISH é um procedimento que fornece informações úteis para a elucidação de possíveis funções biológicas dos genes de estudo. Com a técnica padronizada no laboratório, novos estudos poderão ser realizados em moluscos, com o objetivo de localizar transcritos de outras isoformas do citocromo P450, bem como de outros genes de biotransformação, tendo em vista serem famílias gênicas normalmente induzidas por xenobióticos.

Visando a aplicabilidade da ISH em estudos ecotoxicológicos, realizamos um estudo integrado da técnica de ISH combinado com técnicas histológicas, histoquímicas e análises químicas, e observamos possíveis efeitos que o fenantreno pode causar nos órgãos das ostras ao longo do tempo de exposição ao fenantreno.

Atualmente existe uma carência de estudos que comprovem que o fenantreno possa causar danos histopatológicos que comprometam a saúde das ostras. Em nosso estudo, observamos que o aparecimento de atrofia tubular possivelmente esta relacionada com a exposição ao fenantreno. Foi observado também o potencial do manto como órgão-alvo de bioacumulação de contaminantes, em virtude do aparecimento de mucócitos que aumentou seu percentual com o passar dos dias de exposição.

Assim, a identificação de possíveis alterações teciduais decorrentes da exposição à fenantreno torna-se importante, podendo ser proposta como biomarcadores da contaminação aquática

7. CONCLUSÕES

- Ostras bioacumulam fenantreno ao longo dos dias de exposição;
- O aumento da atrofia tubular no grupo controle sugere que as ostras não se alimentaram suficientemente durante o experimento;
- O estado nutricional e o fenantreno podem estar agindo de forma sinérgica na atrofia tubular das ostras;
- O aumento significativo no percentual de células mucosas no manto pode indicar que o muco é um mecanismo de proteção contra a exposição ao fenantreno nesta espécie;
- A técnica de ISH mostrou-se eficaz na localização dos transcritos de *CYP2AUI* nos tipos celulares de diferentes órgãos: Brânquia, manto, intestino, glândula digestiva e gônada;
- A maior intensidade de reação do *CYP2AUI* foi encontrada nas células epiteliais das brânquias. Os grupos tratados apresentaram maior reação positiva em relação ao controle, podendo indicar que as células deste órgão respondem ao estresse induzido pela exposição de fenantreno;
- No manto, os lobos internos apresentaram maior intensidade de reação do *CYP2AUI* possivelmente por estarem em contato direto com o xenobiótico;
- No intestino a intensidade do sinal foi maior nas células epiteliais próximas ao lúmen e as células mais próximas ao tecido conjuntivo. Esse padrão pode estar relacionado a uma diferença funcional destes tipos celulares na biotransformação de xenobióticos;
- A transcrição do gene *CYP2AUI* na glândula digestiva pode estar relacionada tanto com a exposição ao fenantreno quanto a atrofia tubular/estado nutricional;
- A transcrição do *CYP2AUI* nas gônadas dos machos de *C. brasiliiana* sofre influência do estágio reprodutivo.

8. AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudo, ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) pelo fornecimento dos animais, ao Laboratório de Malacologia Experimental (LAMEX) do Núcleo de Estudos de Patologia Aquícola (NEPAQ) e ao Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) pelo auxílio com as análises químicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCAM, **ISH- In situ hybridization protocol**. In: (<http://www.abcam.com/protocols/ish-in-situ-hybridization-protocol>).

Acessado em 12 de julho de 2013, 15h13min

ALBERS, P. H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman, D. J. et al. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 330-355, 1995.

ANYAKORA, C. et al. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. **Journal of Chromatography**, p.323–330, 2005.

AU, D. W. et al. Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: effects on gamete quality. **Environmental Pollution**, v.111, p.1–9, 2001.

BARROSO-CHINEA, P. et al. Detection of two different mRNAs in a single section by dual in situ hybridization: A comparison between colorimetric and fluorescent detection. **Journal of Neuroscience Methods**, v.162, p.119–128, 2007.

BARSZCZ, C. et al. Chronic effects of three crude oils on oysters suspended in estuarine ponds. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.1, p.879-896, 1978.

BAYEN, S.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. **Environmental Research**, v.103, p.375-382, 2007.

BIGNEL, J. P. et al. Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. **Marine Environmental Research**, v.72, p.25-32, 2011.

CALDWELL, G. S. et al. First evidence of sperm motility inhibition by the diatom aldehyde 2E, 4E-decadienal. **Marine Ecology Progress**, v.273, p.97–108, 2004.

CARBALLEIRA, C. et al. Linking d15N and histopathological effects in molluscs exposed in situ to effluents from land-based marine fish farms. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.2633–2641, 2011.

CARGNIN-FERREIRA, E.; SARASQUETE, C. **Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos**. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. 2008.

COAN, E. V. et al. Bivalve Seashells of Western North America - Marine Bivalve Mollusks from Arctic Alaska to Baja California, **Santa Barbara Museum of Natural History**, v. 2, p. 9-40, 2000.

COUCH, J. A. Atrophy of diverticular epithelium as an indicator of environmental irritants in the oyster, *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research**, v.14, p.525-526, 1984.

DHEILLY, N. M. et al. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: Identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns, **BMC Genomics**, v.12, p.1-16, 2011.

DIMITRIADIS, V. K. et al. Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. **Journal of Molecular Histology**, v.35, p.501–509, 2004.

DON, R. H. et al. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4008, 1991.

DUMBAULD, B. R.; RUESINK, J. L.; RUMRILL, S. S. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. **Aquaculture**, v.290, p.196-223, 2009.

EBLE, A. F.; SCRO, R. General Anatomy In: KENNEDY, V.S, NEWELL, R.I.E; EBLE, A.F (Eds.) **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***. Maryland: Maryland Sea Grant College, p.19-73, 1996.

EERTMAN, R. H. et al. Response of the blue mussel *Mytilus edulis* following exposure to PAHs or contaminated sediment. **Marine Environmental Research**, v. 39, p.1169-1173, 1995.

EINSPORN, S.; KOEHLER, A. Immuno-localisations (GSSP) of subcellular accumulation sites of phenanthrene, aroclor 1254 and lead (Pb) in relation to cytopathologies in the gills and digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. **Marine Environmental Research**, v.66, 185–186, 2008.

ELLIS, M. S. et al. **Histopathology Analysis**. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 130, Silver Spring, Maryland, p.234, 1998.

FASULO, S. et al. Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. **Aquatic Toxicology**, v.88, p.62–68, 2008.

FELPETO, M. J. **Los Moluscos Bivalvos: Aspectos Citogenéticos e Moleculares y aplicados**. Universidade da Coruña. Ed. Universidade da Coruña, Serviço de Publicaciones, p.239, 2001.

FIGUEIREDO, L. H. M. **Investigação das contribuições orgânicas antrópicas e naturais em sedimentos costeiros utilizando-se hidrocarbonetos marcadores**. 1999. 169f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro. 1999.

FITZPATRICK, J. L. et al. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147, p.441-449, 2008.

FLORES-NUNES, F. **Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e de expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário.** 2013. 183f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.

FLORES-NUNES, F. **Avaliação in situ da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do pacífico *Crassostrea gigas* na baía norte da ilha de Santa Catarina .** 2008. 55 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

FOWLER, J.; COHEN, L. **Practical statistics for field biology**, John Wiley & Sons, New York, p.259, 1998.

GABARDO, I. T. **Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar.** 2007. 235 f. (Tese de Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

GALTSOFF, P.S. **The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin.** United States Department of the Interior, Washington, D.C. 1964.

GEORGE, S.G; PIRIE, B.J.S; COOMBS, T.L., The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.23, p.71-84, 1976.

GOMES, R.P., **Transcrição de genes citocromo p450 em ostra *Crassostrea gigas*.** 2013. 111f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.

GOSLING, E. **Bivalve Molluscs Biology, Ecology, and Culture.** Blackwell Publishing, Oxford, p.495, 2003.

HALL, T, BioEdit: An important software for molecular biology. **Bulletin of Biosciences**, v.2, p.60-61, 2011.

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, p.779-784, 2010.

HAWKINS, A.J.S.; BAYNE, B.L. Physiological interrelations and the regulation of production. In: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture (ed. E.M. Gosling), **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p. 171–222, 1992.

HENKE, R.T. et al. Expression analysis of mRNA in formalin-fixed, paraYn-embedded archival tissues by mRNA in situ hybridization. **Methods**, v.38, p.253–262, 2006.

HINES, A. Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. **Analytical Biochemistry**, v. 369, p. 175–186, 2007.

HOLOPAINEN, J. I.; LOPEZ, R. G. Functional Anatomy and histology of the digestive tract of fingernails clams (Sphaeriidae, Bivalvia). **Annales Zoologici Fennici**, v.16, p.61-72, 1989.

HOWARD A.W.; SMITH C. S. **Histological techniques for marine bivalve mollusks**. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole, 1983.

HUANG, X.; MADAN, A., CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, p.868-877, 1999.

KENNISH, M. J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, p.494, 1992.

KRISHNAKUMAR, P. K. et al. Effects of chemical contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington. II. Cytochemical detection of subcellular changes in digestive cells. **Marine Biology**, v.124, 251–259. 1995.

LOWE, D. M. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. **Marine Ecology Program**, v.46, p.91-100, 1988.

LOWE, D. M.; PIPE, R. K. Cellular responses in the mussel *Mytilus edulis* following exposure to diesel oil emulsion: Reproductive and nutrient storage cells. **Marine Environmental Research**, v.17, p.234-237, 1985.

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**, v.152, p.324–334, 2014.

LÜCHMANN, K. H. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

MACLEOD, W.D. et al. **Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility**, 1985- 1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U.S. Department of Commerce, NOAA/NMFS Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, p.121, 1986.

MARIGÓMEZ, I. et al. Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks, **Microscopy Research and Technique**, v.56, p.358–392, 2002.

MARIGÓMEZ, I. et al. **Cell-type replacement, a successful strategy of mollusks to adapt to chronic exposure to pollutants**. Cuad. Invest. Biol, v.20, p.255–258, 1998.

MARIGÓMEZ, I. et al. **Morphofunctional patterns of cell and tissue systems involved in metal handling and metabolism**. In: Cajaraville, M.P. (Ed.), Cell Biology in Environmental Toxicology. University of the Basque Country, p.89–134, 1995.

MARTOJA, R.; MARTOJA-PIERSON, F. M. **Técnicas de histología Animal**, Toray-Masson, Barcelona. 1970.

MIX, M.C; SPARKS, A. K. Studies on the Histopathological Effects of Ionizing Radiation on the Oyster *Crassostrea gigas* I. The Degenerative Phase Involving Digestive Diverticulae, Stomach, and Gut. **Journal of invertebrate pathology**, v.16, p.14-37, 1970.

MORTON, B. Feeding and digestion in Bivalvia. In: Saleuddin, A.S.M., Wilburg, M. (Eds.), **Mollusca**. Academic Press, New York, v.5, p.65-147, 1983.

MOORE, M. N. Responses of the Mussel *Mytilus edulis* to Copper and Phenanthrene: Interactive Effects. **Marine Environmental Research**. v.14, p.167-183, 1984.

MÜLLER, I.C. **Caracterização e avaliação de metalotioneína como biomarcador de exposição a cádmio no mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

MULLER-FEUGA, A. et al. The microalgae of aquaculture. In: STRØTTRUP, J.G. and MCEVOY, L.A. **Live feeds in marine aquaculture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p.206-251, 2003.

OKADA, Y. Molecular characterization and expression analysis of chitinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part B, v.165 p.83-89, 2013.

OLIVEIRA, M. P. et al. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following shortterm exposure to phenanthrene. **Chemosphere**, p.1284-1291, 2007.

PICCARDO, M. T. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution in native and caged mussels. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.941-956, 2001.

RAMOS, C.O. et al., Maturation of the Mangrove Oyster *Crassostrea gasar* at Different Temperatures in the Laboratory. **Journal of Shellfish Research**, v.33, p.187-194, 2014.

RAMOS, C.O. et al. Maturation of native oyster *Crassostrea gasar* at different diets in the laboratory. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, p.107-120, 2013.

ROUX, K. H. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. **Bio Techniques**, v.16, p.812-814. 1994.

SARKAR, A. et al. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring, **Ecotoxicology**, v.15, p.333-340, 2006.

SCHÄFER, S.; KÖHLER, A. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. **Marine Environmental Research**, v. 68 p. 128–136, 2009.

SCHÄFER, S. et al. Sex-specific biochemical and histological differences in gonads of sea urchins (*Psammechinus miliaris*) and their response to phenanthrene exposure. **Marine Environmental Research**, v.71, p.70-78, 2011.

SUNILA, I. Acute Histological Responses of the Gill of the Mussel, *Mytilus edulis*, to Exposure by Environmental. **Journal of invertebrate pathology**, v.52, p.137-141, 1988.

TIBURTIUS, E.R.L. et al. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v.28, p.61-64, 2005.

UNEP - United Nations Environment Programme, **Guidance for a Global Monitoring Programme for Persistent Organic Pollutants**. Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Geneva, Switzerland, 2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), **Occurrence of Contaminants of Emerging Concern in Wastewater From Nine Publicly Owned Treatment Works**. 2009. 85p. Disponível em <http://migre.me/fmm2B>

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Aquatic Science**, v.1, p.295–317, 1989.

WANG, L. et al. Expression of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 439–447, 2010.

WAXMAN, D. J.; AZAROF, F. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression, **Biochemical Journal**, v.28, p.577-592, 1992.

WEINSTEIN, J. E. Fluoranthene-Induced Histological Alterations in Oysters, *Crassostrea virginica*: Seasonal Field and Laboratory Studies. **Marine Environmental Research**, v.43, p. 201-218, 1997.

WIDDOWS, J. et al. Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water-accommodated fraction of North Sea oil. **Marine Biology**, v.67, p.15-311, 1982.

WOTTOM, E. C. et al. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. **Aquatic Toxicology**, v.65, p.13-25, 2003.

YOSHIMINE, R. V. et al. Regional assessment of PAHs contamination in SE Brazil using brown mussels *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p.2581–2587, 2012.

ZORITA, I. et al. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. **Aquatic Toxicology**, v.78, p.109–116, 2006.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABESSA, D. M. S. et al., Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 875-885, 2005.

ALBERS, P. H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman, D. J. et al. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 330-355, 1995.

ALBERTS, B. et al., **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, p.757, 1999.

ALBINATI, A. C. L. et al., **Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n.3, p. 621-627, 2009.

BAER, W. **The Brazilian economy: growth and development**. Boulder: Lynne Rienner Publishers, p.443, 2008.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 ed. Bookman. Porto Alegre – RS, 2002.

BARROSO-CHINEA, P. et al., Detection of two different mRNAs in a single section by dual in situ hybridization: A comparison between colorimetric and fluorescent detection. **Journal of Neuroscience Methods**, v.162, p.119–128, 2007.

BAYEN, S.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. **Environmental Research**, v.103, p.375-382, 2007.

BELLWOOD, D. R. et al., Confronting the coral reef crisis. **Nature**, v.429, p.827-833, 2004.

BRANDO, W.J. Proibida a venda de ostras do Sul de Florianópolis. **Zero Hora**, Florianópolis, 08 abr. 2008, cad Geral.

COSTA, P.M. et al., Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. **Aquatic Toxicology**, p.142-143, 2013.

COUCH, J. A. Prospective study of infectious and noninfectious diseases in oysters and fishes in three Gulf of Mexico estuaries. **Disease aquatic organism**, v.31, p.59-82, 1985.

DA ROS, L.; NESTO, N. Cellular alteration in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: field studies in the lagoon of Venice (Italy). **Environmental international**, v.31, p.1078-1088, 2005.

DE MAAGD, G. J.; VETHAAK A. D., Biotransformation of PAHs and their carcinogenic effects in fish. **Handbook of Environmental Chemistry**, p.265-309, 1998.

DODDS, L. A. et al., Metabolic tolerance of the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) to temperature and dissolved oxygen change. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.349, p.205-214, 2007.

DORE, I. **Shellfish**: a guide to oyster, mussel, scallops, clams and similar products for the comercial user. New York: Van Nostrand Reinhold, p.240, 1991.

DUMBAULD, B. R.; RUESINK, J. L.; RUMRILL, S. S. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. **Aquaculture**, v.290, p.196-223, 2009.

EINSPORN, S; KOEHLER, A. Immuno-localisations (GSSP) of subcellular accumulation sites of phenanthrene, aroclor 1254 and lead (Pb) in relation to cytopathologies in the gills and digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. **Marine Environmental Research**, v. 66, 185–186, 2008.

EISEL, D.; GRÜNEWALD-JANHO, S.; KRUCHEN, B. (Eds.). **DIG Application Manual for Nonradioactive in situ hybridization**. 3. ed. Penzberg: Roche Diagnostics GmbH, p.242, 2002.

ELER, M.N.; MILLANI, T.J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aqüicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.33-44, 2007.

ENRÍQUE-DÍAZ, M. et al., Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. **Aquaculture International**, v.17, p.491-506, 2009.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). 2013. **Síntese informativa da Maricultura 2013**, <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/S%C3%ADntese-informativa-da-maricultura-2013.pdf>, acessado em 25 de junho de 2014, 16h05min

EPAGRI/CEPA, 2010. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina. Sidaura Lessa Graciosa and Zélia ALVES Silvestrini (Ed).315. In: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepapublicacoes/sintese_2010.pdf, acessado em 13 março de 2013, 12h05min

EPE (Empresa de Pesquisa Energética). **Balço Energético Nacional 2014**. Ministério de Minas e Energia / Relatório de Síntese ano base 2013. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/S%C3%ADntese%20do%20Relat%C3%B3rio%20Final_2014_Web.pdf

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2006**. Rome, Italy, p.180, 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE: Opportunities and challenges**. Rome, Italy, p. 243, 2014.

FASULO, S. et al., Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. **Aquatic Toxicology**, v.88, p.62–68, 2008.

FERREIRA, J.F.; OLIVEIRA NETO, F.M. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. **Infofish 4**, p.10, 2006.

FIGUEIREDO, L.H.M. **Investigação das contribuições orgânicas antrópicas e naturais em sedimentos costeiros utilizando-se hidrocarbonetos marcadores**. 1999. 169f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro. 1999.

FLORES-NUNES, F. **Avaliação in situ da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do pacífico *Crassostrea gigas* na baía norte da ilha de Santa Catarina**. 2008. 55 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

FLORES-NUNES, F. **Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e de expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário**. 2013. 183f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.

GABARDO, I.T. **Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar**. 2007. 235 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

GOMES, C.H.A.M. **Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório**. 2009. 57f. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

GREENPEACE, Atlas do Mar, petróleo e biodiversidade: A geografia do conflito, p-16, 2010. Disponível em: <http://www.greenpeace.org/brasil/Global/brasil/report/2010/11/altas2.pdf> f. Acessado em: 20/07/2014.

HALPERN, B. S. et al., A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, v.319, p.948-952, 2008.

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, p.779-784, 2010.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2nd ed. Florida: Lewis Publishers, 1995.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – Dinâmica populacional e rede coletora de esgoto. *In: Atlas de saneamento 2011*. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão / Diretoria de Geociências. Rio de Janeiro, 2011.

ITOH, N.; TAKAHASHI, K.G. cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.148, p.160–166, 2007.

JANER, G.; PORTE, C. Sex steroids and potential mechanisms of nongenomic endocrine disruption in invertebrate. **Ecotoxicology**, v.16, p. 145-160, 2007.

JERINA, D.M. et al., Carcinogenicity of benzo(a)pyrenederivates: the bay region theory. **Pure and Applied Chemistry**, v.50, p.1033-1044, 1978.

JVANOLLI. Exames em moluscos coletados na Baía Sul deram negativo para presença de Ascarel. **Companhia integrada de desenvolvimento agrícola de Santa Catarina (CIDASC)**. Florianópolis, 31 jan. 2014, cad Notícias. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2013/01/31/exames-em-moluscos-coletados-na-baia-sul-deram-negativo-para-presenca-de-ascarel/>

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, p.494, 1992.

KREMER, R.; Celesc será multada em R\$ 50 milhões pelo Ibama por vazamento de óleo, em Florianópolis. **Diário Catarinense**, Florianópolis, 21jan. 2014, cad Geral.

LAM, K.; MORTON, B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia, Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. **Aquaculture**, v. 228, p. 1-13, 2003.

LIN, S.; STEINCHEIN, D. J. A method for determining the stability of lysosomal membranes in the digestive cells of *Mytilus edulis*. **Marine Ecology Progress Series**, v.115, p.237-241, 1994.

LINS, J.A.P.N et al. Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. **Revista Acadêmica Ciência Agrária Ambiental**, v. 8, p. 469-484, 2010.

LIVINGSTONE, D. R.; KIRCHIN, M. A.; WISEMAN, A. Cytochrome-P-450 and Oxidative-Metabolism in Mollusks. **Xenobiotica**, v. 19, n.10, p.1041-1062, 1989.

LÜCHMANN, K.H. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

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**, v.152, p.324–334, 2014.

MARTIN, M., K. E.; OSBORN, P. B.; GLICKSTEIN, N. Toxicities of Ten Metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* Embryos and Cancer magister Larvae. **Marine Pollution Bulletin**, v.12, p.305-308, 1981.

MARTINS, C. C. et al., Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 1359-1563, 2008.

McCOOK, L. J. Macroalgae, nutrients and phase shifts on coral reefs: scientific issues and management consequences for the Great Barrier Reef. **Coral Reefs**, v.18, p.357-367, 1999.

MELO, A.G.C. et al., Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**, v.33, p. 564-572, 2010.

MOURA, J. F. D. et al., A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças, impactos socioeconômicos e relações benéficas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, p.3469-3480, 2011.

MOORE, M.N. Responses of the Mussel *Mytilus edulis* to Copper and Phenanthrene: Interactive Effects. **Marine Environmental Research**. v.14, p.167-183, 1984.

MOREL, C.M.A. Pesquisa em saúde e os objetivos do milênio: desafios e oportunidades globais, soluções e políticas nacionais. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v.9, p.261-270, 2004.

MYERS, M. S.; FOURNE, J. W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic anenvironmental stressors. in S. M. Adams, editor. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. **American Fisheries Society**, p.221-288, 2002.

NOAA, Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program, National Benthic Surveillance and Mussel Watch Projects 1984–1992. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. Technical Memorandum NOS ORCA 71. 1993.

NYSTRÖM, M.; FOLKE, C.; MOBERG, F. Coral reef disturbance and resilience in a human-dominated environment. **Trends in Ecology & Evolution**, v.15, p.413-417, 2000.

O'CONNOR, T.P.; BELIAEFF, B. Recent trends in coastal environmental quality: Results from the Mussel Watch Project. National Status and Trends Program, U.S. **National Oceanic and Atmospheric Administration**, Silver Spring, MD. 1995.

OLIVER, L.M. et al., Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. **Aquatic Toxicology**, v.55, p. 203-222, 2001.

OLIVEIRA, M. P. et al. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following shortterm exposure to phenanthrene. **Chemosphere**, p.1284-1291, 2007.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Síntese Informativa da produção de moluscos comercializados em 2007 no Estado de Santa Catarina**. EPAGRI/ Cedap, 2008.

PAVEI, P.T. **Caracterização e estudo do comportamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em ecossistemas aquáticos contaminados pelas atividades de mineração de carvão**. 2007. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Criciúma, 2007.

PERDUE, J.A.; BEATTIE, J.H.; CHEW, K.K. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. **Journal of Shellfish Research**, v.1, p.9-16, 1983.

PETRIDIS P; JHA A; LANGSTON W.J, Measurements of the genotoxic potential of (xeno-) oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.8-15, 2009.

PIE, M.R. et al., A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*: Bivalvia:Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquatic Research**, v.37, p.1598-1600, 2006.

PICCARDO, M.T. et al., Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution in native and caged mussels. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.941-956, 2001.

REWITZ, K. F. et al., Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n.4, p. 363-381, 2006.

RIBA, I., M. C. et al., Bioavailability of heavy metals bound to sediments affected by a mining spill using *Solea senegalensis* and *Scrobicularia plana*. **Marine environmental research**, v.58, p.395-399, 2004.

SAKAMOTO, K. et al., Immunohistochemical, in situ hybridization and biochemical studies on endogenous cellulase of *Corbicula japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.150, p.216-221, 2008.

SARASQUETE C. et al., A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of *Sparus aurata*. **The Histochemical Journal**, p.337-344, 1993.

SARKAR, A et al., Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring, **Ecotoxicology**, v.15, p.333-340, 2006.

SCOTT, G.F; **Developmental Biology**. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 8^o ed, 2006.

SCHWAIGER, J. et al., The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.6, p.75-86, 1997.

SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.5, p.79-97, 1988.

SILVA-VALENZUELA, M.G. et al., Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 207-213, 2006.

SIVIERO, F. **Biologia Celular: Bases moleculares e metodologia de pesquisa.** São Paulo: Editora Roca, p.486, 2013.

SINDERMANN, C. J. Effects on Living Resources and Humans. **Ocean Pollution.** CRC Press, Boca Raton, 1996.

SCHÄFER, S.; KÖHLER, A. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. **Marine Environmental Research**, v. 68, p. 128–136, 2009.

SCHÄFER, S. et al. Sex-specific biochemical and histological differences in gonads of sea urchins (*Psammechinus miliaris*) and their response to phenanthrene exposure. **Marine Environmental Research**, v.71, p.70-78, 2011.

STEGEMAN, J. J. Benzo[a]Pyrene Oxidation and Microsomal-Enzyme Activity in the Mussel (*Mytilus edulis*) and Other Bivalve Mollusk Species from the Western North-Atlantic. **Marine Biology**, v.89, p. 21-30, 1985.

TIBURTIUS, E.R.L. et al., Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v.28, p.61-64, 2005.

UNEP/GPA (United Nations Environment Programme and the Protection of the Marine Environment from Land-based Activities). **The state of the marine environment-trends and processes.** The Hague, Netherlands, p.28, 2006.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Occurrence of Contaminants of Emerging Concern in Wastewater From Nine Publicly Owned Treatment Works.** 2009. 85p. Disponível em <http://migre.me/fmm2B>.

VALENTI, W.C. Aquicultura sustentável. In: **Congresso de Zootecnia**, 12, Vila Real, Portugal, 2002.

VAZ, C. **Desenvolvimento de metodologia para teste de toxicidade crônica com mysidopsis juniae (silva, 1979) para aplicações em análises de ambientes marinhos.** 2012. 226 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

VEIGA, I.G. **Avaliação da Origem dos Hidrocarbonetos em Sedimentos Superficiais de Manguezais da Região Norte da Baía de Todos os Santos, Bahia.** 2003. 167f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e Exploração) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Macaé, Rio de Janeiro. 2003.

VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M.G.; HELBING, C.C. Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.76, p.23–38, 2012.

VERBRUGGEN, E.M.J.; HERWIJNEN, R. V., Environmental risk limits for phenanthrene. **Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)**, p.50, 2011.

WAXMAN, D J; AZAROFF, Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression, **Biochemical Journal**, v.28, p.577-592, 1992.

WOŁOWICZ, M., K. et al., Neoplasia in Estuarine Bivalves: Effect of Feeding Behaviour and Pollution in the Gulf of Gdansk (Baltic Sea, Poland), **R. F. Dame and S. Olenin**, p.165-182, 2005.

WIDDOWS, J., DONKIN, P., Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling, E. (Ed.), *The Mussel Mytilus : Ecology, Physiology, Genetics and Culture.* **Elsevier**, Amsterdam, p. 383-424, 1992.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações.** São Paulo: Editora Rima, p.464, 2006.

ZANETTE, J. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes.** 2009. 180f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa de

Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

ZANETTE, J et al, Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves, **Marine Environmental Research**, v. 69, p. S1-S3, 2010.

ZORITA, I. et al., Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 220, p.186–196, 2007.

ANEXO A – Imagem do gel de eletroforese em agarose 2% do produto de PCR realizado após digestão do DNA plasmidial (Banda com 672 pb)

