

FLÁVIA LUCENA ZACCHI

**RESPOSTAS MOLECULARES E DE ENZIMAS DE
BIOTRANSFORMAÇÃO EM OSTRAS *Crassostrea brasiliana*
(Lamarck, 1819) EXPOSTAS A HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E DIFERENTES
SALINIDADES.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Prof. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis
2017

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

Zacchi, Flávia Lucena

Respostas moleculares e de enzimas de
biotransformação em ostras *Crassostrea brasiliana*
(Lamarck, 1819) expostas a hidrocarbonetos
policíclicos aromáticos e diferente salinidades. /
Flávia Lucena Zacchi ; orientador, Afonso Celso
Dias Bainy, 2017.

205 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Biomarcadores. 3. Salinidade.
4. HPAs. 5. qPCR. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Respostas moleculares e de enzimas de biotransformação em ostras
Crassostrea brasiliana (Lamarck, 1819) expostas a hidrocarbonetos
policíclicos aromáticos e diferentes salinidades**

Por

FLÁVIA LUCENA ZACCHI

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

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

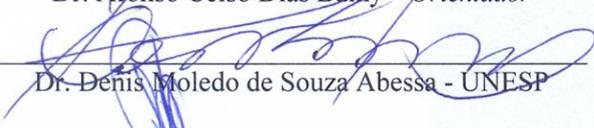


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

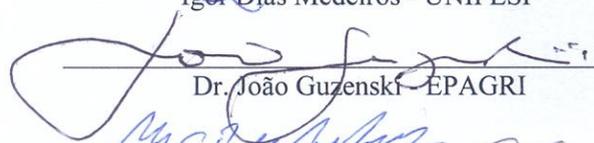


Dr. Afonso Celso Dias Bainy – *Orientador*

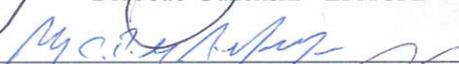


Dr. Denis Moledo de Souza Abessa - UNESP

Igor Dias Medeiros - UNIFESP



Dr. João Guzinski - EPAGRI



Dr. Marcos Caivano Pedroso De Albuquerque - UFSC

Dra. Maria Risoleta Freire Marques - UFSC

**Aos meus amores e
maiores incentivadores:
Denise, Alexandre, Lara e Sun.**

AGRADECIMENTOS

Embora este documento final carregue um só nome e autoria, o processo ao longo destes anos de doutorado dependeram da dedicação e parceria de tantas outras pessoas. A longa e sinuosa estrada não foi percorrida sozinha, e a vocês, agradeço com todo o meu amor:

Aos meus amados pais Denise e Alexandre, pelo incentivo incondicional às minhas escolhas e por plantarem tanto amor em cada cuidadosa atitude em minha educação e formação desde o primeiro dia em que estivemos juntos. Vocês sempre serão minha mais feliz referência!

Ao meu esposo Sun, meu companheiro de sorrisos, de escolhas e de caminhadas. Obrigada por fazer parte tão intensamente da minha vida e desse doutorado: de planejamentos a experimentos até discussões de resultados, e pela força que sempre brota na incansável vontade de me ver feliz! “Se a vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida, que bom que eu te encontrei”!

A Lara, minha pequena grande irmã, por ter as melhores ideias do mundo, e por me fazer abrir os olhos para tanto humano que sempre há por detrás de toda a ciência! Ainda ao Marcelo, meu cunhado e companheiro de longas conversas mirabolantes que ninguém entende. Minha dupla MaLa favorita, amo nossos momentos juntos!

Ao meu orientador Afonso Bainy, por toda a confiança em mim depositada e por contribuir diretamente com o meu crescimento ao longo destes dez anos de LABCAI. Ainda, obrigada por todos os ensinamentos, conversas e pela força para que cada parte desse trabalho se concretizasse.

Ao LABCAI, a todas as alegrias que me proporcionou e tem me proporcionado, e, sobretudo, ao que este lugar tem de melhor: as pessoas! O LABCAI me presenteou com grandes amigos! Agradeço em especial ao Jacó e ao Fabrício, simplesmente essenciais para esse trabalho, desde a idealização até o último ponto final. A Daína e Marília pela parceria fraternal forte no primeiro e segundo experimentos. Ao Gui Toledo pelas incansáveis correções, troca de ideias e ensinamentos de bioinformática. Ao Clei e Ísis, pela força e companhia em todos os experimentos. Aos queridos Tomás, Miguel, Camila, Bárbara Othero, Rômi, Gabrielle, Juliana Tisca, Álvaro, Bárbara Righetti, Raphaella e Camilla Parenti, por toda a ajuda durante dias de experimento, bancada e momentos de descontração. Ainda ao Gui Razzera, Karim, Juliana Moser e Riso, que

sempre estiveram prontos a me ajudar, dentro e fora do laboratório. Obrigada!

A minha grande família amada, em especial aos meus avós Juarez e Maria Inês; minha madrinha Julia e meu padrinho Alan; meus tios Inês, Romeu, Márcio e Vânia; meus primos queridos Carolina, Ana Luiza, Rafaela, Mateus e Eduardo; minha afilhada Beatriz; minha querida Eti; e ainda à vó Lula e vó Iná, ausentes desse mundo, presentes no coração. A Lu e Dona Lourdes, família que me recebeu de maneira tão acolhedora. Vocês são o meu incentivo, minha tranquilidade e minha inspiração. Amo vocês, família!

Aos amigos queridos, que estão ao meu lado há tanto tempo e que fazem a vida ser tão mais leve, confortável e sorridente: Valquíria, Caio, Tamilly, Taysi, Junior, Yara, Diego, Deyse, Gustavo, Alan, Bárbara, Maria, Léo, Miryane, Carolina, Ane e Jully. Obrigada pela força e cumplicidade.

Ao professor Denis Abessa, pela confiança que me permitiu participar de um projeto tão especial e realizar um doutorado sanduíche na Itália, que me trouxe tanto aprendizado e crescimento. Ainda, a Luciane A. Maranhão, pelas discussões e trocas de ideia sobre o projeto.

Al professore Tomaso Patarnello e ai miei amici dell'Università degli Studi di Padova. Sono grata per tutto quello che mi hanno insegnato. Specialmente a Marianna e Massimo con cui ho avuto il piacere di lavorare e che mi hanno accolto tantissimo bene.

A Lucia, la mia cara compagna di casa, per la pazienza di insegnarmi l'italiano e farmi conoscere il più bello di Padova.

Aos queridos Jessica, Maria Izabela e Victor, pela companhia, parceria e força durante o tempo em que passei em Padova. A distância do Brasil ficou menor com vocês por perto.

Ao Carlos Henrique Gomes, por toda a ajuda na aclimação das ostras do primeiro experimento, e ainda aos professores Marcos de Albuquerque e Cláudio Melo, pelas ostras do primeiro experimento e pela disponibilidade do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM).

A Rita de Cássia Rodrigues e ao Emílio K. Gottschalk, do Empório do Mar Sul Floripa, por nos fornecer as ostras do segundo experimento.

Ao pessoal do Instituto Oceanográfico da USP: Sílvio Sasaki, Satie Taniguchi e professora Márcia Bicego, pela realização das análises químicas.

Aos professores da Pós-Graduação em Aquicultura, pelos ensinamentos e aprendizado, e ao Carlito Klunk, pelo auxílio e compreensão nas questões administrativas.

Aos professores Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques, Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, Dr. Igor Dias Medeiros, Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque e ao Dr. João Guzanski pela participação e contribuição nesse trabalho como membros da banca, bem como às professoras Dr^a. Karim Hahn Lüchmann e Dr^a Juliana Righetto Moser e aos professores Dr. Eduardo Alves de Almeida e Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, membros suplentes da banca.

A Anita N. Schwertz e ao Juliano V. Luiz, pela força de sempre na organização do laboratório de bioensaios.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectivamente, pelas bolsas de estudo e doutorado sanduíche concedidas.

Ao projeto Petrobras Dispersantes e a todos os seus integrantes, por tanto aprendizado, nas mais variadas áreas de conhecimento.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT/TA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 307467/2013-9, pelo financiamento do projeto.

RESUMO

Animais estuarinos, como a ostra nativa *Crassostrea brasiliana*, possuem mecanismos fisiológicos e bioquímicos de adaptação e tolerância às variações de salinidade constantes destes ambientes. Além destas variações, os estuários estão sob constante pressão das atividades antrópicas e recebem diariamente resíduos constituídos por misturas complexas de compostos químicos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos fenantreno, pireno e fluoreno. A ostra nativa *C. brasiliana* possui viabilidade zootécnica e econômica para cultivo, além de mostrar-se potencial espécie biomonitora em programas de monitoramento ambiental em estuários. Com o objetivo de avaliar respostas moleculares e bioquímicas de *C. brasiliana* expostas a diferentes HPAs e salinidades, e contribuir com a busca de novos biomarcadores de contaminação por HPAs, neste trabalho foi avaliada, em um primeiro experimento, a influência de três salinidades (35, 25 e 10 ‰) nos níveis transcricionais de genes relacionados ao metabolismo de biotransformação, ao metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos e de genes que codificam para enzimas antioxidantes, em brânquias de *C. brasiliana* expostas ao fenantreno ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Genes de biotransformação de fase I (*CYP2A1* e *CYP2-like1*) e fase II (*GSTm-like* e *GSTQ-like*) foram afetados principalmente pela exposição ao fenantreno e salinidade, respectivamente. Os resultados de interação entre os fatores salinidade e fenantreno nos genes *CYP2-like2* e *SULT-like* sugerem que, em baixas salinidades, as ostras são mais susceptíveis aos efeitos do fenantreno em nível transcricional. O efeito da salinidade sobre os genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante (*CAT-like* e *SOD-like*) e metabolismo de aminoácidos (*GAD-like*, *GLYT-like*, *ARG-like* e *TAUT-like*) sugere um importante papel desses genes na codificação de proteínas que envolvem proteção contra danos oxidativos e adaptações celulares à salinidade. Em um segundo experimento, foram avaliadas as respostas moleculares e de enzimas de biotransformação em brânquias de *C. brasiliana* expostas a duas concentrações de pireno (50 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) e fluoreno (100 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$). A exposição ao pireno induziu significativamente a transcrição dos genes e atividade de enzimas de biotransformação de fase I e II: *CYP1-like*; *CYP2-like*, *CYP356A1-like*; *CYP2A1*; *GSTQ-like*; *GSTm-like*; *SULT-like*; atividade GSTm e EROD, ressaltando a importância desse processo em *C. brasiliana*. Em resposta à exposição ao fluoreno, houve o aumento da transcrição apenas do gene *CYP2A1*. A maior quantidade de respostas encontradas no

pireno comparadas ao fluoreno, pode estar relacionada à maior lipofilicidade do pireno, tendendo à maior interação hidrofóbica com as camadas lipídicas da membrana celular e do retículo endoplasmático, facilitando sua entrada. Em suma, este estudo mostra o envolvimento de genes e enzimas relacionados com o sistema de biotransformação de fase I e II de HPAs em ostras *C. brasiliana* e evidencia os efeitos da salinidade sobre a transcrição de genes do sistema antioxidante e do metabolismo de aminoácidos. Além disso, contribui na busca de novos biomarcadores de contaminação aquática por HPAs e sugere o uso do gene *CYP2A1* como potencial biomarcador molecular em ostras *C. brasiliana* expostas a estes compostos.

Palavras-chave: Aquicultura, biomarcadores, salinidade, HPAs, qPCR.

ABSTRACT

Estuarine animals, such as the oyster *Crassostrea brasiliana*, possess physiological and biochemical mechanisms of adaptation to tolerate constant salinity changes. These ecosystems are under constant pressure due to anthropogenic activities and receive high input of xenobiotics, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as phenanthrene, pyrene and fluorene. Oysters *C. brasiliana* show zootechnical and economical viability for aquaculture and are a potential biomonitoring species in environmental programs. The aim of this study was to evaluate biochemical and molecular responses in *C. brasiliana* exposed to different PAHs and salinities in order to search for new potential biomarkers of PAH contamination. In the first study, the transcriptional changes in gills of oysters exposed to phenanthrene (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) kept at three salinities (35, 25 e 10 ‰) were evaluated. Phase I (*CYP2A1* e *CYP2-like1*) and phase II (*GSTm-like* e *GST Ω -like*) biotransformation genes in gill of oysters were affected mainly by phenanthrene exposure and salinity, respectively. The interaction effects of salinity and phenanthrene upon *CYP2-like2* and *SULT-like* genes suggest that at low salinity oysters were more responsive to the phenanthrene effects at the transcriptional level. Antioxidant defense metabolism (*CAT-like* e *SOD-like*) and amino acid metabolism (*GAD-like*, *GLYT-like*, *ARG-like* e *TAUT-like*) -related genes were responsive to salinity, suggesting an important role of these genes in codifying proteins involved in oxidative damage protection and salinity cellular adaptation. In a second study, molecular and enzymatic biotransformation responses were evaluated in gills of oysters exposed to pyrene (50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and fluorene (100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Pyrene exposure strongly induced *CYP1-like*; *CYP2-like*, *CYP356A1-like*; *CYP2A1*; *GST Ω -like*; *GSTm-like*; *SULT-like* gene transcription and GSTm and EROD activity, highlighting the importance of phase I and II biotransformation processes in *C. brasiliana*. Oysters exposed to fluorene showed an increase only in *CYP2A1* transcript levels. The highest amount of responses found in pyrene compared to fluorene exposure may be associated to the pyrene higher lipophilicity. The greater hydrophobic interaction between pyrene and lipid layers of the cell membrane and endoplasmic reticulum, facilitates its entry. Thereby, these studies show the involvement of genes and enzymes related to PAH phase I and II biotransformation system in *C. brasiliana*. In addition, they highlight the effects of salinity in the transcript levels of antioxidant and amino acid metabolism -related genes.

They also contribute to the identification of new biomarkers of aquatic PAH contamination and suggests the use of *CYP2A1* gene as potential molecular biomarker in oysters, *C. brasiliensis*, exposed to these compounds.

Keywords: Aquaculture, biomarkers, salinity, PAHs, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Crescimento população mundial em bilhões de habitantes ao longo dos anos. Em destaque, valores atuais de população mundial, para o ano de 2017, entre 7 e 8 bilhões de habitantes. 36

Figura 2. Ostra nativa *Crassostrea brasiliana*: caracterização taxonômica e anatômica (anatomia externa e interna com as brânquias em destaque)..... 41

Figura 3. Nome e estrutura química dos HPAs listados e frequentemente monitorados de acordo com as recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), da União Europeia (EU) e do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) resoluções número 357/2005 (CON357) e 454/2012 (CON454). Em destaque: fenantreno, fluoreno e pireno, HPAs utilizados nos Capítulos 2 e 3 deste estudo. 47

Figura 4. Esquema simplificado das reações de fase I e II de biotransformação envolvidas na metabolização dos HPAs, exemplificado através da metabolização do Benzo[a]pireno (B[a]P), composto modelo em estudos de carcinogenicidade de HPAs. Enzimas de fase I: Citocromo P450 (P450s); Epóxido hidrolase (EH); NAD(P)H quinona oxidoreductase (NQO1) e enzimas de fase II: Glutathione S-transferase (GST); Sulfotransferase (SULT); UDP-glucuronosiltransferase (UDPGTs). 49

CAPÍTULO 2

Figura 1. Porcentagem de consumo (●) e depleção (■) do fenantreno ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) medidos por fluorescência na água dos aquários durante 24 h de exposição: (A) Salinidade 35; (B) Salinidade 25 e (C) Salinidade 10. 72

Figura 2. Níveis de transcritos dos genes: (A) *CYP356A1-like*; (B) *CYP2-like1*; (C) *CYP2AUI*; (D) *CYP2-like2*; (E) *SULT-like*; (F) *GSTΩ-like* e (G) *GSTM-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias

entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade $35 \pm$ desvio padrão ($p < 0,05$), para $n=10$ 78

Figura 3. Níveis de transcritos dos genes: (A) *CAT-like* e (B) *SOD-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade $35 \pm$ desvio padrão ($p < 0,05$), para $n=10$ 80

Figura 4. Níveis de transcritos dos genes: (A) *GLYT-like*; (B) *TAUT-like*; (C) *ARG-like* e (D) *GAD-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade $35 \pm$ desvio padrão ($p < 0,05$), para $n=10$ 83

Figura 5. Desenho esquemático representando as variações dos níveis de transcritos em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a fenantreno em duas salinidades: 10 e 35..... 84

Figura Suplementar 1. Níveis de transcritos dos genes normalizadores usados: (A) *40S_s3-like* e (B) *40S_s9-like* e dos genes normalizadores testados: (C) *28s-like*; (D) *β ACT-like*; (E) *α TUB-like*; (F) *β TUB-like*; (G) *ANK-like*; (H) *EF-1 α -like* e (I) *GAPDH-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade $35 \pm$ desvio padrão ($p < 0,05$), para $n=10$ 86

Figura Suplementar 2. Concentração de fenantreno ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno (F) em tempo zero horas (Pré exposição) e após 96 h (Pós exposição). 89

Figura Suplementar 3. Níveis de transcritos dos genes: (A) *ARNT-like*; (B) *GPx-like* e (C) *FABP-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade $35 \pm$ desvio padrão ($p < 0,05$), para $n = 10$ 90

CAPÍTULO 3

Figura 1. Concentração de pireno e fluoreno medidos por fluorescência na água dos aquários com (Consumo) ou sem (Depleção) ostras *Crassostrea brasiliana*, durante 24 h de exposição: (A) Experimento de exposição ao Pireno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P100) e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P50) e Controle com DMSO, sem ostras; (B) Experimento de exposição ao Fluoreno $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F200) e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e Controle com DMSO, sem ostras. 121

Figura 2. Concentração de pireno (A) e fluoreno (B) ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos moles de *Crassostrea brasiliana* em tempo zero (T0), 24 e 96 horas de exposição: controle (CT); pireno $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P50) e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P100); fluoreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F200). 122

Figura 3. Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP1-like*, (B) *CYP2A1*, (C) *CYP2-like*, (D) *CYP356A1-like*, (E) *GST Ω -like*, (F) *GSTM-like*, (G) *SULT-like* em brânquias de ostras *C. brasiliana* de grupos controles (CT) e expostos ao Pireno: $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (P50) e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (P100). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão. 124

Figura 4. Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP1-like*, (B) *CYP2A1*, (C) *CYP2-like*, (D) *CYP356A1-like*, (E) *GST Ω -like*, (F) *GSTM-like*, (G) *SULT-like* em brânquias de ostras *C. brasiliana* de

grupos controles (CT) e expostos ao Fluoreno: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (F100) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (F200). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão. 125

Figura 5. Atividade enzimática em 24 h e 96 h em brânquias de ostras *C. brasiliiana* de grupos controles (CT) e expostas ao Pireno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P100) e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P50): (A) EROD, (B) GSTm, (C) GST; e ao Fluoreno 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F200) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F100): (D) EROD, (E) GSTm, (F) GST. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão. 126

Figura Suplementar 1. Desenho experimental das exposições de ostras *C. brasiliiana* aos HPAs: (A) Pireno 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P50) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P100); e (B) Fluoreno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F200). Número de ostras por aquário = 6, em triplicata. 135

Figura Suplementar 2. Esquema de linha do tempo para detalhamento de alimentação de ostras *Crassostrea brasiliiana* durante período de aclimação e exposição ao Pireno ou ao Fluoreno. Durante o período de exposição, ao final de cada alimentação, houve nova diluição do respectivo HPA na água dos aquários. Legenda: Em vermelho, período em dias de aclimação. Em azul, período de exposição: Tempo zero de exposição (T0); Tempo 24 horas de exposição (24 h); Tempo 96 horas de exposição (96 h). Em verde, momentos em que a alimentação foi fornecida (A). 136

APÊNDICE A

Figura 1. Sistema de filtração de efluentes composto de duas bombonas com capacidade para 200 L, cada. (A): Bombona para estoque de água; (B): Bombona com elementos filtrantes; (C) Bomba hidráulica; (D) Torneira para coleta de amostra. 187

Figura 2. Elementos filtrantes utilizados no sistema para retenção dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 188

Figura 3. Concentração relativa do fenantreno em água utilizada no experimento do Capítulo 2. Entrada: água residual pós experimento; Saída: água após 24 h em sistema de filtração. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$). 189

Figura 4. Concentração relativa do pireno em água utilizada no experimento do Capítulo 3. Entrada: água residual pós experimento; Saída: água após 24 h em sistema de filtração. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$). 190

Figura 5. Concentração relativa do fluoreno em água utilizada no experimento do Capítulo 3. Entrada: água residual pós experimento; Saída: água após 24 h em sistema de filtração. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$). 190

APÊNDICE B

Figura 1. Mapa demonstrando os locais no Brasil e datas de coleta de *Crassostrea rhizophorae*. Locais de São Paulo – SP: Bora Bora (Referência) e São Vicente (Contaminado) e locais de Santa Catarina – SC: Sambaqui (Referência) e Rio Bücheller (Contaminado). 196

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Genes selecionados e suas respectivas funções, sequências de iniciadores e tamanhos de amplicon. 66

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Genes selecionados e suas respectivas sequências de iniciadores e tamanhos de amplicon. 116

APÊNDICE B

Tabela 1. Relação dos trinta genes mais vezes transcritos (logCPM de maior valor) após filtragem por valores de razão FC entre 0,99 e 1,01 com seus respectivos códigos de acesso do Uniprot. 198

Tabela 2. Revisão bibliográfica de estudos com normalizadores em moluscos bivalves. *TUB: tubulina; UBQ: ubiquitina; ANK: anquirina; GAPDH: gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase; ACT: actina; RIB: ribossomal; EF: fator de alongação; ARF: fator de ribosilação; HELI: helicase.* 200

Tabela 3. Genes normalizadores selecionados e sugeridos para *Crassostrea rhizophorae*, função biológica relacionada, código de acesso no Uniprot e respectivos valores de logFC, razão de FC e logCPM. *RIB: ribossomal; ACT: actina; ANK: anquirina; EF: fator de alongação; RNA HELI: helicase; ARF: fator de ribosilação.* 201

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Neste documento, aminoácidos e nucleotídeos seguem o padrão da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) para abreviaturas e siglas. Símbolos métricos seguem o padrão do Sistema Internacional de Unidades.

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACT: gene *Actina*

AhR: Receptor de Hidrocarboneto Aromático

ANK: gene *Anquirina*

ARG: enzima Arginase

ARG: gene *Arginase*

ARNT: Translocador Nuclear de AhR

ARNT: gene *Translocador Nuclear de AhR*

B[a]P: Benzo[a]Pireno

C10: grupo controle exposto à salinidade 10%

C25: grupo controle exposto à salinidade 25%

C35: grupo controle exposto à salinidade 35%

CAT: enzima Catalase

CAT: gene *Catalase*

cDNA: DNA complementar

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

cm: centímetro

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CT: Grupo controle

Ct: ciclo do limiar de detecção em uma reação de qPCR; do inglês *cycle threshold*

CON357: Resolução número 357 de 2005 do CONAMA

CON454: Resolução número 454 de 2012 do CONAMA

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CYP450 (ou CYP): Citocromo P450 – número após a sigla representa família

CYP450 (ou *CYP*): gene *Citocromo P450* – número após a sigla representa família

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTT: DL-ditiotreitol
E: eficiência da reação de qPCR
EF: gene *Fator de Elongação*
EH: enzima Epóxido Hidrolase
EPA: Agência de Proteção Ambiental; do inglês *Environmental Protection Agency*
EROs (*ROS*): Espécies Reativas de Oxigênio; do inglês *Reactive Oxygen Species*
EU: União Europeia
EROD: 7-etóxi-resorufina O-deetilase
F10: grupo exposto ao fenantreno e à salinidade 10%
F25: grupo exposto ao fenantreno e à salinidade 25%
F35: grupo exposto ao fenantreno e à salinidade 35%
F100: grupo exposto ao fluoreno 100 µg/L
F200: grupo exposto ao fluoreno 200 µg/L
FABP: Proteína Ligante de Ácidos Graxos
FABP: gene da *Proteína Ligante De Ácidos Graxos*
FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação; do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FLU: fluoreno
g: grama
G6PDH: enzima Glicose 6-fosfato Desidrogenase
GAD: enzima Glutamato Descarboxilase
GAD: gene *Glutamato Descarboxilase*
GAPDH: gene *Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase*
GC-MS: técnica acoplada de cromatografia gasosa e espectrometria de massa; do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*
GLYT: gene *Transportador de Glicina*
GPx: enzima Glutationa Peroxidase
GPx: gene *Glutationa Peroxidase*
GR: Rlutationa Redutase
GSH: Glutationa reduzida
GSHt: Glutationa total
GSSG: Glutationa oxidada
GST: enzima Glutationa S-transferase
GST: gene *Glutationa S-transferase* – letra após a sigla representa isoforma
h: horas
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HELI: gene *Helicase*

HPAs: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HSP90: Proteína de Choque Térmico 90
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IO-USP: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; do inglês *high-performance liquid chromatography*
Kg: quilograma
L: litro
LABCAI: Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LABQOM: Laboratório de Química Orgânica Marinha
LMM: Laboratório de Moluscos Marinhos
logFC: logaritmo da medida da expressão gênica; do inglês *fold change*
logCPM: logaritmo da contagem por milhão
m: metros
M: molar
MAPEG: Proteínas Associadas de Membrana Envolvidas no Metabolismo de Eicosanóides e Glutathione
máx: máximo
MDA: malondialdeído
mg: miligrama
min: minutos
mín: mínimo
mL: mililitro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
MXR: proteína de Resistência a Múltiplos Xenobióticos
n: número amostral
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
NEPAq: Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola
ng: nanograma
nm: nanômetro
nM: nanomolar
n^o: número
NQO1: NAD(P)H Quinona Desidrogenase
Nrf2: Fator Nuclear Eritróide
Nrf2: gene *Fator Nuclear Eritróide*
O₂⁻: ânion superóxido
OH⁻: radical hidroxila
opt: ótimo
°C: graus Celsius

%: porcentagem
‰: partes por mil ou g.Kg^{-1} (g de sal por Kg de água)
p: peso
p: significância estatística
P50: grupo exposto ao pireno 50 $\mu\text{g/L}$
P100: grupo exposto ao pireno 100 $\mu\text{g/L}$
pb: pares de base
PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*
pH: potencial hidrogeniônico
PHE: fenantreno; do inglês *phenanthrene*
PIR: pireno
PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PMT: Fotomultiplicador
PR: Paraná
qPCR: PCR quantitativo em tempo real
 R^2 : parâmetro de avaliação de eficiência de qPCR em tempo real
RNA: ácido ribonucléico
s: segundos
SC: Santa Catarina
SIM: monitoramento seletivo de íons; do inglês *selective ion monitoring*
SOD: enzima Superóxido Dismutase
SOD: gene *Superóxido Dismutase*
SP: São Paulo
SULT: enzima Sulfotransferase
SULT: gene *Sulfotransferase* - letra após a sigla representa isoforma
T0: tempo zero de exposição
TAUT: gene *Transportador de Taurina*
TUB: gene *Tubulina*
UBQ: gene *Ubiquitina*
UDPGT: Uridina 5'-difosfo-Glucuronosiltransferase
Udesc: Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
UNESP: Universidade Estadual Paulista
UNIPD: *Università degli Studi di Padova*
USP: Universidade de São Paulo
v: volume
XAP2: Proteína 2 co-chaperona associada à Proteína co-chaperona X
xg: força centrífuga aplicada

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	31
1. INTRODUÇÃO GERAL	31
1.1. Considerações sobre a estrutura geral do texto	31
1.2. Problemática e justificativa	33
1.3. Revisão bibliográfica	35
1.3.1. O crescimento populacional, a fome e a aquicultura como oferta de alimentos	35
1.3.2. As espécies do gênero <i>Crassostrea</i>	37
1.3.3. O cultivo de ostras no Brasil	39
1.3.4. A ostra nativa <i>Crassostrea brasiliana</i>	40
1.3.5. Influência da salinidade em mecanismos fisiológicos de moluscos bivalves	42
1.3.6. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	45
1.3.7. Metabolismo de biotransformação dos HPAs	48
1.3.8. Estresse oxidativo causado por HPAs	49
1.3.9. Fenantreno, fluoreno e pireno	50
1.3.10. Biomarcadores de contaminação aquática	52
1.4. Objetivos e considerações sobre a estrutura do texto	55
1.4.1. Objetivo geral	55
1.4.2. Objetivos específicos	55
CAPÍTULO 2	57
2. VARIAÇÕES TRANSCRICIONAIS EM OSTRAS <i>Crassostrea brasiliana</i> (Lamarck, 1819) EXPOSTAS AO FENANTRENO EM DIFERENTES SALINIDADES	57
2.1. Resumo	58
2.2. Abstract	59
2.3. Introdução	60
2.4. Material e métodos	62
2.4.1. Animais e condições de exposição	62
2.4.2. Concentração de PHE na água	63
2.4.3. Análise dos níveis de PHE nos tecidos de <i>C. brasiliana</i>	64
2.4.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa	64
2.4.5. Reações de qPCR e análises estatísticas	65
2.5. Resultados e discussão	71
2.5.1. Níveis de PHE na água e nos tecidos de ostras mantidas a diferentes salinidades	71
2.5.2. Respostas transcricionais de genes de biotransformação em brânquias de <i>C. brasiliana</i>	73

2.5.3. Respostas transcricionais de genes relacionados ao estresse oxidativo em brânquias de <i>C. brasiliana</i>	79
2.5.4. Respostas transcricionais de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e lipídios em brânquias de <i>C. brasiliana</i>	81
2.6. Conclusão	85
2.7. Material suplementar	86
2.8. Referências bibliográficas.....	91
CAPÍTULO 3.....	107
3. RESPOSTAS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS DO SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE OSTRAS <i>Crassostrea brasiliana</i> (Lamarck, 1819) EXPOSTAS A PIRENO E FLUORENO.	
.....	107
3.1. Resumo	108
3.2. Abstract.....	109
3.3. Introdução	110
3.4. Material e métodos.....	112
3.4.1. Desenho experimental e exposição dos animais ao pireno e fluoreno.....	112
3.4.2. Concentração de PIR e FLU na água.....	114
3.4.3. Análise dos níveis de PIR e FLU nos tecidos moles de <i>C. brasiliana</i>	114
3.4.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa.....	115
3.4.5. Reações de qPCR.....	115
3.4.6. Atividades das enzimas de biotransformação	118
3.4.7. Estatística dos dados	119
3.5. Resultados.....	119
3.5.1. Níveis de PIR e FLU na água dos aquários e em tecidos de <i>C. brasiliana</i>	119
3.5.2. Nível de transcritos de genes de biotransformação.....	123
3.5.3. Atividade de enzimas de biotransformação	126
3.6. Discussão	127
3.7. Conclusão	134
3.8. Material suplementar	135
3.9. Referências bibliográficas.....	136
CAPÍTULO 4.....	155
4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	157
APÊNDICE A.....	187

Sistema de filtração de efluentes contaminados por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	187
APÊNDICE B	195
Levantamento de potenciais genes normalizadores em transcriptoma de glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> coletadas em quatro locais do litoral brasileiro.....	195

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Considerações sobre a estrutura geral do texto

Este documento está organizado em quatro Capítulos e dois Apêndices.

O Capítulo 1 contém a justificativa da realização desse trabalho, uma revisão bibliográfica de temas abordados ao longo do desenvolvimento da tese, e ainda o objetivo geral e os objetivos específicos.

O Capítulo 2 apresenta os resultados da avaliação dos níveis de transcrição gênica em brânquias de ostras *Crassostrea brasiliana* expostas ao fenantreno em diferentes salinidades, na forma de artigo científico, com algumas informações suplementares. Esse capítulo foi publicado na revista *Aquatic Toxicology* (ZACCHI et al., 2017) e parte dos seus dados (referentes aos genes normalizadores e não publicados nessa primeira revista), foram publicados na revista *Environmental Toxicology and Chemistry* (MÜLLER et al., 2017).

O Capítulo 3 apresenta resultados da avaliação molecular e bioquímica do sistema de biotransformação de ostras *Crassostrea brasiliana* expostas a pireno e fluoreno. Esse capítulo está redigido na forma de artigo e formatado de acordo com as normas da revista *Aquatic Toxicology*. Os experimentos desse Capítulo foram realizados simultaneamente com duas espécies de ostras: *Crassostrea brasiliana* e *Crassostrea gigas*. Os resultados de ambas espécies serão submetidos como uma mesma publicação, possibilitando desta forma a comparação entre as respostas moleculares e enzimáticas entre as duas espécies de ostra. Os resultados referentes à ostra *C. brasiliana* são parte integrante dessa tese (Flávia Lucena Zacchi) e os resultados referentes à ostra *C. gigas* são parte integrante da tese de Marília Nardelli Siebert, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

O Capítulo 4 apresenta as conclusões gerais da tese e perspectivas para a realização de novos estudos.

O Apêndice A descreve o sistema de filtração de efluentes contaminados por HPAs, desenvolvido e montado para a descontaminação dos resíduos referentes aos experimentos dos Capítulos 2 e 3. São apresentados neste Apêndice ainda, resultados que mostram os

HPAs quantificados na água de entrada e de saída do sistema, antes e após 24 h de filtração.

O Apêndice B apresenta alguns resultados referentes ao trabalho realizado em doutorado sanduíche, na Università degli Studi di Padova (UNIPD), Pádua, Itália, no período de setembro de 2015 a janeiro de 2016, sob a supervisão do professor Dr. Tomaso Patarnello. Estes resultados são provenientes do projeto intitulado *Gene expression profiling of marine-estuarine bivalves from Brazil: applications of basic sciences as a tool in environmental monitoring*, CNPq Processo nº 202829/2015-4, coordenado pelo professor Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil. Para serem apresentados nesta tese foram escolhidos resultados das análises transcriptômicas, sequenciadas em plataforma Illumina, realizadas em glândula digestiva de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em quatro locais: dois locais em São Paulo, SP e dois locais em Florianópolis, SC. Ainda que de forma preliminar, esse Apêndice mostra genes com potencial de utilização como normalizadores. Essa etapa é de extrema importância para a posterior validação dos genes de interesse, por técnicas de PCR quantitativo.

De acordo com o regulamento vigente do Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, os capítulos contendo os resultados da tese devem estar, preferencialmente, na forma de artigo científico e formatados de acordo com as normas da revista escolhida para a submissão. A formatação dos Capítulos 2 e 3 não está de acordo com as normas da ABNT. Para tanto, o Capítulo 1 e Apêndices, não escritos em formato de artigo científico, foram formatados nas normas da ABNT. Para facilitar a leitura e a localização do leitor, ao longo do documento foram utilizadas continuamente as numerações das sessões, vinculando-as ao número de cada Capítulo. Todavia, a numeração das Tabelas e Figuras em cada Capítulo inicia-se a partir de 1. As referências bibliográficas dos Capítulos 2, 3 e Apêndices estão dispostas ao final destes. As referências bibliográficas do Capítulo 1, no entanto, encontram-se após o Capítulo 4.

1.2. Problemática e justificativa

A distribuição dos 7,3 bilhões de habitantes não é homogênea entre as regiões do planeta. A densidade populacional é significativamente maior nas regiões costeiras comparadas às regiões interioranas (SMALL; NICHOLLS, 2003). As zonas costeiras tornaram-se regiões atrativas à população humana em função da sua grande disponibilidade de recursos naturais; da sua representatividade logística, através de pontos de acesso ao comércio marítimo e de transporte; e da possibilidade da prática, no seu entorno, de atividades recreativas, culturais e de subsistência (NEWMANN et al., 2015). Como consequência da pressão dos seus recursos naturais, os ambientes costeiros de estuários e manguezais tornaram-se frequentes receptores de contaminantes.

Rejeitos das atividades antrópicas lançados nas regiões estuarinas, representam misturas complexas ricas em compostos químicos, também chamados de xenobióticos (CONNELL, 1990; LIVINGSTONE, 1998), como por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Os HPAs constituem uma classe de diversas moléculas orgânicas hidrofóbicas, contendo dois ou mais anéis benzênicos fundidos e apresentando ou não grupos substituintes ligados, normalmente presentes dentre os contaminantes ambientais (BEYER et al, 2010). Naftaleno, fenantreno, pireno, fluoreno, criseno, antraceno, benzo[e]pireno e benzo[a]pireno são alguns exemplos de HPAs encontrados e estudados em ambientes aquáticos contaminados e áreas de biomonitoramento (BEYER et al., 2010; LÜCHMANN et al., 2011; RAMACHANDRAN et al., 2006; RAMDINE et al., 2012; ZANETTE et al., 2011). Pelo fato de alguns HPAs serem considerados agentes carcinogênicos, esta classe de contaminantes é de alta prioridade nos estudos de biomonitoramento ambiental e programas de avaliação de riscos ecológicos de descargas de efluentes (BEYER et al., 2010).

Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas no sentido de monitorar a qualidade da água e avaliar os efeitos tóxicos causados pela presença de contaminantes, dentre as quais, se destacam os biomarcadores. Segundo Walker et al. (1996), biomarcadores são alterações biológicas em nível molecular, bioquímico, celular e fisiológico que podem expressar os efeitos tóxicos causados pelos xenobióticos. Nesse sentido, muitos estudos têm utilizado respostas bioquímicas e moleculares em moluscos bivalves (ALMEIDA et al., 2007; RICHARDSON et al., 2008; LÜCHMANN et al., 2011; SAENZ et al., 2010; SEABRA PEREIRA et al., 2011; ZANETTE et al., 2011), como por exemplo em ostras. As ostras possuem a capacidade de bioacumular

contaminantes do ambiente e de responder rapidamente à sua exposição (BEBIANNO; BARREIRA, 2009; SOLÉ et al., 2007). São animais sésseis, filtradores, possuem ampla distribuição geográfica e, em muitos casos, são espécies dominantes em seu hábitat. Além disso, possuem grande importância econômica, sendo um dos animais aquáticos mais cultivados no mundo (BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; FAO, 2016).

O cultivo de ostras é uma atividade geradora de renda que contribui para a conservação dos estuários, diminuindo a pressão sobre os estoques naturais e promovendo uma exploração menos agressiva ao ambiente (GUIMARÃES et al., 2008), porém, a prática do cultivo e engorda desses organismos exige águas isentas de poluição, tornando a preservação ambiental uma medida imprescindível para a realização desta atividade.

No Brasil, apesar de uma produção ainda incipiente, a espécie *Crassostrea brasiliana* (= *Crassostrea gasar*) é cultivada em regiões estuarinas devido, principalmente, às características ambientais propícias ao desenvolvimento desses moluscos, que necessitam de águas de temperaturas amenas e ricas em nutrientes (IBGE, 2015; PROENÇA, 2001; SILVA; ABSHER, 1995). Diversos fatores ambientais influenciam o cultivo e crescimento de ostras em ambientes estuarinos, tais como a produtividade primária, oxigênio dissolvido, salinidade, profundidade, dinâmica de correntes e sólidos em suspensão. Dentre esses fatores, a salinidade possui notável importância, pois apresenta variações diárias e sazonais nos estuários, sendo influenciada pelo regime de marés e períodos de chuva (VILANOVA; CHAVES, 1988). Estas variações de salinidade podem influenciar tanto de maneira isolada quanto sinérgica as respostas bioquímicas e moleculares de animais expostos a diferentes contaminantes nestes ambientes. Alguns trabalhos foram realizados a fim de elucidar os mecanismos e vias metabólicas influenciadas pelas variações de salinidade (DAMÁSIO et al., 2011; LEONARD et al., 2011; ZANETTE et al., 2011; ZACCARON DA SILVA et al., 2005; ZHAO et al., 2012).

Alterações bioquímicas e moleculares no sistema antioxidante e de biotransformação de xenobióticos foram relatadas em ostras da espécie *C. brasiliana* expostas à fração de óleo diesel acomodada em água (LÜCHMANN et al., 2011) e ao fenantreno (LÜCHMANN et al., 2015). A análise do transcriptoma de brânquias e glândula digestiva dessa mesma espécie exposta à fração de óleo diesel acomodada em água, a fenantreno e a esgoto sanitário identificou genes potencialmente envolvidos na biotransformação de xenobióticos e associados ao sistema de defesa antioxidante e mecanismos de estresse. Adicionalmente, gerou

uma vasta biblioteca de genes de interesse ecotoxicológico para estudos com *C. brasiliiana* (LÜCHMANN et al., 2015). Em outro trabalho, foram observadas diferenças em análises bioquímicas e moleculares realizadas em ostras *C. brasiliiana* coletadas em duas baías do Sul do Brasil (Guaratuba-PR e Babitonga-SC), variabilidade que pode estar associada às diferentes salinidades, onde os animais foram coletados (ZACCHI, 2013). Porém, inexistem estudos que avaliem a interação da salinidade aliada à exposição aos HPAs em *C. brasiliiana*.

Em função da importância biológica e econômica dos estuários, ambientes fortemente influenciados pelas variações de salinidade e contaminações de origem antrópica, a realização desta tese justifica-se no sentido de avaliar a influência desses fatores nas respostas moleculares e/ou bioquímicas das ostras nativas estuarinas *C. brasiliiana*. Assim sendo, o presente trabalho visou avaliar a influência da salinidade sobre as respostas moleculares de *C. brasiliiana* expostas a fenantreno, e analisar respostas moleculares e de enzimas de biotransformação de ostras *C. brasiliiana* expostas a dois diferentes HPAs (pireno e fluoreno), com a finalidade de contribuir na busca de potenciais biomarcadores de exposição a contaminantes ambientais em ostras *C. brasiliiana*.

1.3. Revisão bibliográfica

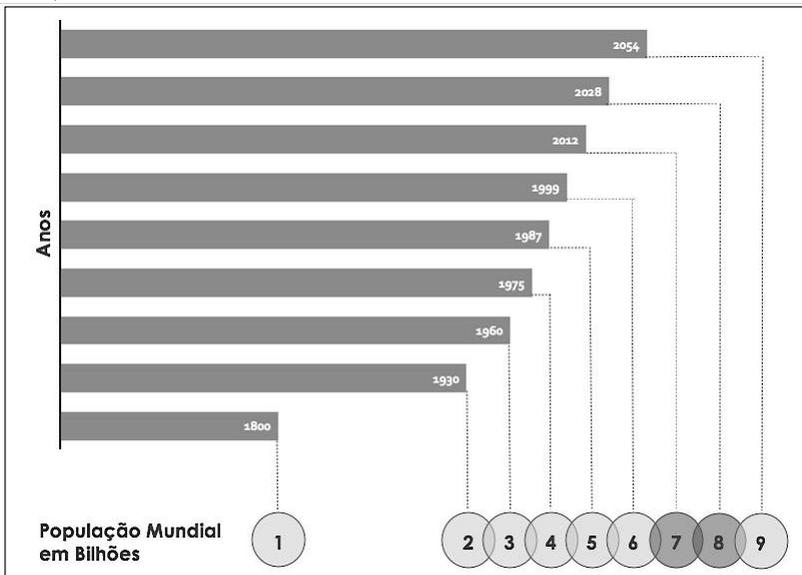
1.3.1. O crescimento populacional, a fome e a aquicultura como oferta de alimentos

A partir do século XIV, o crescimento populacional mundial tem se intensificado. No ano de 1930, habitavam no planeta Terra cerca de 2 bilhões de pessoas. Em 1960, este número alcançou a marca de 3 bilhões, chegando a mais de 5 bilhões em 1980 e a 7,3 bilhões no ano de 2015 (Figura 1) (PRB, 2016; UN, 2015). Embora não sejam as únicas, o aumento da população e sua relação com a má distribuição de renda estão entre as causas que explicam as altas taxas de subnutrição crônica mundial (WHES, 2016). Segundo a FAO (2015), estima-se que um em cada nove, ou 795 milhões de pessoas, compõem a parcela acometida pela fome, uma vez que aumentos na população mundial aumentam também a dificuldade de proporcionar um padrão de vida igualitário para todos.

Como tentativa de amenizar este problema, a aquicultura mostra-se uma atividade viável de produção e oferta de alimentos. Ademais, a produção aquícola é uma alternativa de controle da sobreexploração dos recursos pesqueiros oriunda da pesca extrativa excessiva, ou mesmo através da manutenção e reposição de estoques naturais. O termo

aquicultura refere-se a qualquer atividade com objetivo de desenvolver, engordar e comercializar animais e plantas aquáticas cultivados em água doce, salobra ou salgada (PILLAY; KUTTY, 2005).

Figura 1. Crescimento população mundial em bilhões de habitantes ao longo dos anos. Em destaque, valores atuais de população mundial, para o ano de 2017, entre 7 e 8 bilhões de habitantes.



Fonte: ZACCHI, F.L. (Arquivo pessoal). Dados publicados pelas Nações Unidas (UN, 2017).

Em âmbito mundial, de acordo com o último levantamento realizado pela FAO (2016) a produção aquícola vem crescendo cerca de 5,8% ao ano, com uma produção de pescados que aumentou de 44,3 milhões de toneladas, no ano de 2005, para 73,8 milhões de toneladas no ano de 2014. Os valores de pescados cultivados, a cada ano, estão mais próximos da quantidade de pescados capturados, oriundos da pesca extrativa (93,4 milhões de toneladas mundiais). Dentre esta estatística, que inclui peixes, crustáceos e moluscos, a China é o país de maior produção de pescados provenientes da aquicultura, com um total de 45,5 milhões de toneladas no ano de 2014 (FAO, 2016). A aquicultura mundial movimenta cerca de 160 bilhões de dólares anuais (FAO, 2016) e entre as espécies mais cultivadas no mundo, estão em ordem de maior produção: as carpas (*Ctenopharyngodon idellus*, *Hypophthalmichthys molitrix* e

Cyprinus carpio), o molusco *Ruditapes philippinarum*, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o camarão *Litopenaeus vannamei*. Ainda, dentre as espécies mais cultivadas mundialmente, destacam-se os peixes salmónídeos *Salmo salar* e *Oncorhynchus mykiss*, os crustáceos *Penaeus monodon* e *Procambarus clarkii*, a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* e o bagre americano *Ictalurus punctatus* (FAO, 2016). Ainda em âmbito mundial, a produção total de ostras corresponde a aproximadamente 5 milhões de toneladas. Deste total, aproximadamente 626 mil toneladas correspondem ao cultivo de *C. gigas*, 177 toneladas ao cultivo de *C. gasar* e 1500 toneladas ao cultivo de *C. rhizophorae* (FAO, 2016).

O Brasil aparece como o 13º país no ranking de produção aquícola mundial, com um total de 561.803 toneladas em 2014. Essa produção teve um crescimento de 118% em menos de 10 anos, visto que em 2005 os valores corresponderam a 257.784 toneladas (FAO, 2016). No ano de 2015, último levantamento realizado até o momento, o IBGE registrou uma produção aquícola brasileira de 574.164 toneladas de pescados, avaliada em 4,4 bilhões de reais (IBGE, 2015). Desses valores, 84,14% referem-se ao cultivo de peixes, 12,2% ao cultivo de camarões e 3,66% ao cultivo de ostras, mexilhões e vieiras. A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é o peixe mais cultivado no Brasil, seguida pelo peixe de água doce nativo tambaqui (*Colossoma macropomum*). Juntas, em 2015, essas duas espécies representaram 73,5% de toda a piscicultura brasileira. Ainda relacionado à piscicultura, com produção bem distribuída nas regiões brasileiras, os estados que mais produzem são, em ordem: Rondônia, Paraná, Mato Grosso, Santa Catarina, São Paulo e Ceará. No que diz respeito à carcinicultura, a região Nordeste é responsável pela quase totalidade da produção nacional (99,3%), sendo os estados do Ceará e Rio Grande do Norte os maiores produtores. Finalmente, referente ao cultivo de moluscos, Santa Catarina é o principal estado produtor, com 98,1% da produção nacional (IBGE, 2015). A maricultura catarinense baseia-se na produção de mexilhões *Perna perna*, vieiras *Nodipecten nodosus* e ostras *Crassostrea gigas* (SANTA CATARINA, 2015).

1.3.2. As espécies do gênero *Crassostrea*

A identificação e classificação das espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) vem sendo estudadas ao longo da costa brasileira há mais de três décadas. *C. brasiliiana* (Lamarck, 1819) e *C. rhizophorae* (Guilding, 1828) já foram consideradas sinônimos de uma mesma espécie (SINGARAJAH, 1980) e posteriormente, separadas morfologicamente em duas espécies distintas (NASCIMENTO, 1991).

Rios (1994) sugeriu que todas as espécies nativas da costa brasileira pertenciam à espécie *C. rhizophorae*. Anos mais tarde, a partir de técnicas bioquímicas, Ignacio et al. (2000) tornaram a separar as ostras nativas em duas espécies: *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae*. Corroborando esse estudo, a partir de técnicas moleculares de PCR-RFLP, Lapègue et al. (2002) utilizaram o gene *16S* mitocondrial para relatar a ocorrência de *C. brasiliiana* e de *C. rhizophorae* na costa sulamericana e de uma terceira espécie originária da costa africana: *C. gasar* (Adanson, 1757). Pie et al. (2006), utilizaram a mesma sequência depositada no GenBank por Lapègue et al. (2002) para sugerir que *C. brasiliiana* e *C. gasar* seriam sinônimos entre uma mesma espécie. Análises filogenéticas reforçaram a existência de duas espécies nativas diferentes (*C. rhizophorae* e *C. gasar*) e ainda sugeriram a presença de outra espécie exótica de *Crassostrea sp.*, não identificada e encontrada na ilha de Canelas, no Pará. (MELO et al., 2010a; VARELA et al., 2007) Melo et al. (2010a) ainda reforçaram a proximidade da nova espécie de *Crassostrea sp.* (ilha de Canelas) das espécies de *Crassostrea* da região do Indo-Pacífico, enquanto as outras duas espécies (*C. rhizophorae* e *C. gasar*) seriam filogeneticamente mais próximas das encontradas no Atlântico (por exemplo, *C. virginica*). Espécimes de *C. gigas* (Thunberg, 1793) foram detectados em bancos naturais do sul do Brasil (MELO et al, 2010b). Sua presença, porém, foi atribuída a possíveis escapes provenientes dos cultivos próximos.

Os últimos trabalhos publicados, portanto, reiteraram a ocorrência de quatro espécies do gênero *Crassostrea* ao longo da costa brasileira: duas exóticas (*C. gigas* e *Crassostrea sp.* Canela), e duas nativas: *Crassostrea gasar* ou *Crassostrea brasiliiana* e *C. rhizophorae* (GALVÃO et al., 2012; LAZOSKI et al., 2011; MELO et al., 2013). Amaral e Simone (2014) propuseram uma mudança na classificação e distribuição dessas espécies, baseado em características anatômicas, morfológicas e localização geográfica. Segundo esses autores, não há a ocorrência de *C. rhizophorae* ou *C. gasar* na costa brasileira e sim, *C. mangle* em manguezais do Pará a Santa Catarina, *C. brasiliiana* em manguezais e costões rochosos do Maranhão a Santa Catarina e *C. praia* somente no Rio Grande do Sul. Entretanto, ainda não há análises moleculares que comprovem a ocorrência dessas espécies. Salvi, Macali e Mariottini (2014), realizaram uma análise molecular filogenética mais robusta da família Ostreidae, baseada em sequências combinadas de *loci* mitocondriais e nucleares. Esses autores observaram uma distância genética muito baixa entre as espécies *C. brasiliiana* e *C. gasar*, sugerindo que ambas espécies são sinônimas (SALVI; MACALI; MARIOTTINI, 2014).

Embora ainda confusa, a identificação e localização de ocorrência de cada espécie do gênero *Crassostrea* na costa brasileira é importante para a preservação das espécies e essencial para o sucesso da ostreicultura, na definição de estratégias de produção e marketing na venda dos animais (AMARAL; SIMONE, 2014; VARELA et al., 2007).

1.3.3. O cultivo de ostras no Brasil

O cultivo de ostras no Brasil é caracterizado por três espécies do gênero *Crassostrea*: as nativas *C. brasiliana** e *C. rhizophorae** e a exótica *C. gigas*. A espécie *C. gigas*, ostra mais cultivada no mundo (FAO, 2016), foi inserida no Brasil em meados dos anos 70 quando alguns cultivos experimentais foram iniciados no estado do Rio de Janeiro. Na década de 80, outros surgiram na região de Cananéia (SP) e posteriormente, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou os cultivos de ostras no estado de Santa Catarina (FERREIRA; NETO, 2007). Desde então, o estudo sobre a biologia e ecologia, e o desenvolvimento dos sistemas de ostreicultura para *C. gigas* e ostras nativas vem sendo aprimorados e adequados ao longo do extenso litoral do país (ABSHER; CHRISTO, 1993).

Em Santa Catarina, há a predominância do cultivo da ostra do Pacífico *C. gigas*, espécie que corresponde a 90% da ostreicultura do Brasil (BRASIL, 2013). O sucesso da adaptação dessa espécie em Santa Catarina relaciona-se, principalmente, às baixas temperaturas da água do mar - entre 16°C e 30°C, raramente ultrapassando os 26°C -, uma vez que a sua temperatura ideal de crescimento e reprodução está entre 11°C e 25°C (FERREIRA et al., 2011). Além disso, para essa espécie, a produção é dependente da reprodução em laboratório (*hatchery*) e posterior distribuição das sementes para engorda no mar (FERREIRA et al., 2011). Em SC, o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da UFSC é o fornecedor de sementes de *C. gigas* do Brasil (PUCHNICK-LEGAT, 2015), alimentando e incentivando a produção da região. Em países da América Latina, no entanto, a produção de sementes e a quantidade de laboratórios ainda são escassas, limitando o desenvolvimento da ostreicultura nesses locais (FAO, 2014).

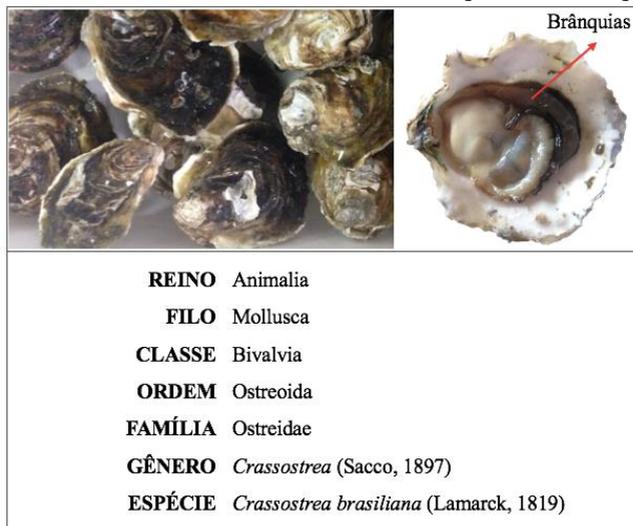
* Nesta tese, por convenção e publicações já realizadas, serão adotadas as nomenclaturas *Crassostrea brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* para as ostras nativas.

Com exceção de Santa Catarina, nos demais estados brasileiros, principalmente estados das regiões Sudeste, Norte e Nordeste onde o crescimento de *C. gigas* é limitado pelas altas temperaturas das águas, há a predominância do cultivo das ostras nativas *C. rhizophorae* e *C. brasiliana* (IBAMA, 2007). No Brasil, o cultivo dessas espécies é comumente restrito a pequenos grupos familiares, pescadores e população ribeirinha local (BALDEZ et al., 2016). Nesses casos, a oferta de sementes é realizada basicamente através do assentamento das larvas em ambiente natural com o uso de coletores artificiais (FERREIRA et al., 2011) ou da extração de ostras juvenis diretamente do ambiente, seguidas da engorda em lanternas suspensas e/ou mesas de madeira fixadas no próprio estuário (GALVÃO et al. 2009; HENRIQUES et al. 2010). Tal atividade, além de reduzir a pressão dos estoques naturais e promover o uso sustentável do meio em que está inserida, contribui para a conservação dos estuários, gera empregos, atua como complemento de renda para pescadores artesanais e fixa populações nativas litorâneas em seu ambiente tradicional (FERREIRA; NETO, 2007; NETO et al., 2013).

1.3.4. A ostra nativa *Crassostrea brasiliana*

Crassostrea brasiliana, comumente denominada de “ostra do mangue” (Figura 2), é uma espécie estuarina encontrada ao longo de toda a costa brasileira, tanto na zona intertidal, fixada em raízes, quanto na zona subtidal, em costões rochosos e manguezais (AMARAL; SIMONE, 2014; GALVÃO et al., 2013; IGNACIO et al., 2000; LAZOSKI et al., 2011; MELO et al., 2010a; MELO et al., 2010b; VARELA et al., 2007). Pode ser encontrada em locais onde a temperatura varia de 23°C a 31°C (NASCIMENTO, 1991). Além disso, por habitar regiões de manguezais e estuarinas, caracterizadas por constantes misturas de água doce fluvial ou pluvial e salina marinha, é uma espécie que tolera grandes variações de salinidade, entre 0‰ e 40‰ (ELLIOTT; MCLUSKY, 2002; NASCIMENTO, 1991; TELESH; KHLEBOVICH, 2010). Tais características fazem com que as ostras *C. brasiliana* sejam consideradas euritéricas e eurialinas.

Figura 2. Ostra nativa *Crassostrea brasiliana*: caracterização taxonômica e anatômica (anatomia externa e interna com as brânquias em destaque).



Fonte: ZACCHI, F.L. (Arquivo pessoal). Taxonomia segundo descrição apresentada pelo Sistema de Informação Taxonômica Integrado (ITIS, “*Integrated Taxonomic Information System*”; <http://www.itis.gov/index.html>).

Apesar de eurialinas, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar as melhores salinidades para crescimento, sobrevivência e reprodução de *C. brasiliana*. Gomes et al. (2014) encontraram maior desenvolvimento reprodutivo em ostras *C. gasar* expostas a salinidade de 24‰, quando comparado aos animais expostos a salinidade de 34‰. Taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e desenvolvimento larval em *C. gasar* apresentaram melhores resultados em salinidade de 28‰ (LEGAT, 2015). A salinidade também influenciou o crescimento e a sobrevivência de *C. gasar*. Em salinidade 25‰ houve maiores taxas de crescimento. As salinidades com valores entre 20‰ e 25‰ resultaram em maior sobrevivência, e finalmente, menores taxas de sobrevivência foram registradas em salinidades de 5‰ e 50‰ (FUNO et al., 2015).

1.3.5. Influência da salinidade em mecanismos fisiológicos de moluscos bivalves

As mudanças de salinidade nos estuários ocorrem a curto prazo, no caso de variações de maré, ou a longo prazo, em períodos de chuva contínua (VERDELHOS; MARQUES; ANASTÁCIO, 2015). A salinidade é um dos principais fatores abióticos que influenciam os organismos estuarinos, como os bivalves, principalmente nos casos de mudanças abruptas, que promovem ambientes fisiologicamente estressantes (GOSLING, 2004; MCLUSKY; ELLIOTT, 2004).

Em moluscos bivalves, essas mudanças de salinidade fazem com que um gradiente osmótico seja formado entre o ambiente externo e os animais, gerando respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas (BERTRAND et al., 2017; CARREGOSA et al., 2014a, 2014b; SARÀ et al., 2008; VERDELHOS; MARQUES; ANASTÁCIO, 2015).

Como uma primeira defesa contra as condições desfavoráveis causadas por uma mudança brusca na salinidade ambiental, os moluscos bivalves podem fechar as valvas e contrair os sifões, para evitar o contato com a água. Essa reação ocorre devido à atividade de receptores localizados principalmente na borda do manto e na superfície dos sifões (BERGER; KHARAZOVA, 1997; DAVENPORT, 1981; SHUMWAY, 1977). Esse comportamento, no entanto, é limitado pela capacidade de manter o metabolismo anaeróbico com as valvas fechadas durante longos períodos de tempo (AKBERALI; MARRIOTT; TRUEMAN, 1977; WANG et al., 2013).

Caso o estresse osmótico permaneça, as valvas tornam a abrir e o transporte iônico é acionado para regular homeostaticamente a pressão osmótica intracelular. Nesse caso, a osmorregulação nos bivalves é mantida principalmente através do uso de íons inorgânicos (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- e K^+) como osmólitos intracelulares (BIANCHINI et al., 2008; EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Uma análise do transcriptoma de ostras *Crassostrea gigas* expostas a estresse hiposmótico mostrou a indução de genes relacionados aos canais iônicos, auxiliando a movimentação livre dos íons do citoplasma para o meio extracelular para balancear a pressão osmótica celular (ZHAO et al., 2012). Entretanto, após longo tempo de exposição ao estresse hiperosmótico, onde a concentração iônica intracelular deve aumentar para osmoregular com o meio extracelular, o acúmulo de íons inorgânicos pode causar danos às células, como problemas no envelhecimento, estabilidade e solubilidade de proteínas (ZHANG; CREMER, 2006).

Compostos orgânicos, como os aminoácidos livres, também podem ser utilizados para igualar a pressão osmótica celular desses organismos, apesar do maior custo energético. Essa característica define os moluscos bivalves como organismos osmoconformadores (CARREGOSA et al., 2014; PIERCE; ROWLAND-FAUX; HOSOI et al., 2007; LIU et al., 2011; O'BRIEN, 1992; WU et al., 2011; YANCEY, 2005). Dentre os principais aminoácidos usados na osmoregulação de moluscos, estão a glicina, prolina, alanina, beta-alanina, arginina, taurina e glutamato (HOSOI et al., 2003; SOMERO; BOWLUS, 1983). A concentração intracelular desses aminoácidos aumenta e diminui em resposta ao aumento e diminuição da pressão osmótica externa (BISHOP et al., 1994). Em condições ambientais hiposmóticas, para ajustar a pressão interna, há o aumento da taxa metabólica dos tecidos dos bivalves seguido da liberação de compostos nitrogenados (amônia e aminoácidos) para o meio extracelular e hemolinfa. Esses compostos são catabolizados pelas brânquias e manto, e posteriormente excretados (BISHOP; GREENWALT; BURCHAM, 1981; SHUMWAY; YOUNGSON, 1979). Nessas condições, portanto, as concentrações de aminoácidos livres dentro das células diminuem e genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos são diferencialmente transcritos (ZHANG et al., 2012). Já em condições hiperosmóticas, as concentrações de aminoácidos livres dentro das células tendem a aumentar (MENG et al., 2013). Em bivalves, a absorção de aminoácidos livres pode ser feita diretamente da água, através das células branquiais, e posteriormente transportados aos tecidos via hemolinfa (RICE; WALLIS; STEPHENS, 1980; STEPHENS; SCHINSKE, 1961; WENDT; JOHNSON, 2006; WRIGHT, 1988).

Os efeitos da salinidade nos processos biológicos de bivalves vêm sendo frequentemente estudados. A partir de um estudo do transcriptoma de brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a diferentes salinidades, foram encontradas alterações nos canais iônicos, aquaporinas e expressão diferencial de genes do metabolismo de aminoácidos, demonstrados como importantes controladores da adaptação osmótica destes animais (MENG et al., 2013). Análises transcriptômicas em brânquias comparativas entre duas espécies de ostras (*C. gigas* – encontrada em salinidades acima de 20‰ e *C. hongkongensis* – espécie mais estuarina, encontrada em salinidade de 10‰ a 20‰) expostas ao estresse hiposmótico (8‰), mostraram maior quantidade de genes diferencialmente transcritos em *C. hongkongensis*, indicando maior facilidade de adaptação ao estresse causado por baixas salinidade, pela espécie mais estuarina. Dentre esses, destacaram-se genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos. No entanto, em ambas espécies, houve

maior nível de transcritos de genes relacionados ao sistema imune após estresse hiposmótico (ZHAO et al., 2014). Além disso, um estudo de proteômica realizado com *C. gigas* exposta a baixas salinidades identificou 15 proteínas diferencialmente expressas nas brânquias, envolvidas principalmente em atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, citoesqueleto, matriz extracelular, vias de sinalização e sistema imune inato (ZHANG et al., 2015).

Além do envolvimento nesses metabolismos, o estresse osmótico está relacionado à supressão do sistema imune em ostras *Saccostrea glomerata* (GREEN; BARNES, 2010) e também à diminuição da atividade fagocítica, aumento de granulócitos e proteínas circulantes em ostras *Pinctada imbricata* (KUCHEL; RAFTOS; NAIR, 2010). Em ostras *Crassostrea gigas*, a diminuição da salinidade induziu a mortalidade de hemócitos em experimentos *in vitro* (GAGNAIRE et al., 2006). Em *Crassostrea virginica*, a prevalência e intensidade do patógeno *Perkinsus marinus* foram positivamente correlacionadas com altas salinidades (CHU; LA PEYRE; BURRESON, 1993). O aumento da susceptibilidade a enfermidades e diminuições na resistência imune foi relatado também em outros bivalves expostos ao estresse osmótico, como mexilhões *Mytilus edulis* (BUSSELL et al., 2008), abalones *Haliotis diversicolor supertexta* (CHENG; JUANG; CHEN, 2004) e moluscos de areia *Ruditapes philippinarum* (REID et al., 2003).

Vias metabólicas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo também são afetadas pelo estresse osmótico em bivalves. Em baixas salinidades, há o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e a ativação da maquinaria celular de defesa antioxidante (LESSER, 2006; MENG et al., 2013). Após exposição ao estresse osmótico, variações nos níveis de transcritos de genes que codificam para enzimas antioxidantes foram observados em abalones *Haliotis discus discus* (DE ZOYSA et al., 2009); ostras *Crassostrea gigas* (MENG et al., 2013) e moluscos de areia *Scapharca broughtonii* (AN; CHOI, 2010). A atividade dessas enzimas também foi alterada, após estresse osmótico em três espécies de moluscos de areia (*Venerupis decussata*, *V. corrugata*, *V. philippinarum*) (CARREGOSA et al., 2014); em bivalves de água doce *Unio tumidus* (DOYOTTE et al., 1997) e em ostras *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas* expostas a óleo diesel (ZACCARON DA SILVA et al., 2005; ZANETTE et al., 2011).

1.3.6. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Formados a partir da união de dois ou mais anéis benzênicos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Figura 3) compõem uma classe de poluentes orgânicos altamente distribuídos nos ambientes aquáticos, na atmosfera e no solo (ALCÁNTARA et al., 2009; KIM et al., 2009; LATIMER; ZHENG, 2003; LAZARTIGUES et al., 2010; LIU et al., 2014). Nesses ambientes, os HPAs podem ocorrer a partir de fontes antropogênicas ou naturais. As fontes antropogênicas de HPAs no ambiente são normalmente classificadas como pirogênicas ou petrogênicas. A primeira, envolve processos de combustão incompleta de materiais orgânicos enquanto a segunda, consiste na descarga ou derramamento de petróleo bruto ou produtos petrolíferos (DAHLE et al., 2003; KAUSHIK; HARITASH, 2006). Além disso, fontes naturais de HPAs podem contribuir significativamente para níveis elevados destes contaminantes no ambiente, tais como: incêndios florestais, infiltrações naturais de petróleo, atividades vulcânicas e conversão de biomoléculas precursoras presentes no sedimento, (FERNANDES et al., 1997; OPUENE et al., 2007; TAN et al., 1996). Essa diversidade de fontes antropogênicas e naturais, resulta em misturas complexas de grande variedade de HPAs em diferentes concentrações (LI et al., 2015).

Embora possam ser formados naturalmente, os HPAs não são facilmente degradados em condições naturais e sua persistência no ambiente está diretamente relacionada ao aumento do peso molecular e, conseqüentemente, ao número de anéis benzênicos (HARITASH; KAUSHIK, 2009). São compostos altamente lipofílicos e sua solubilidade em água diminui na medida em que o número de anéis benzênicos em sua composição aumenta (KIM et al., 2013).

A exposição aos HPAs causa riscos à saúde humana, e alguns, além de tóxicos, possuem característica carcinogênica, mutagênica e/ou teratogênica (KIM et al., 2013). A carcinogenicidade desses compostos está associada à complexidade da molécula, ou seja, ao número e conformação dos anéis benzênicos. (BOSTRÖM et al., 2002).

Em função dessas características, os HPAs são listados nas regulamentações e legislações ambientais de muitos países como uma classe de contaminantes de alta prioridade em análises de riscos à saúde humana e risco ecológico de efluentes. As principais legislações que abordam detalhadamente as quantidades de HPAs na água e sedimento, estão vigentes nos Estados Unidos, através da Agência de Proteção Ambiental (*United States Environmental Protection Agency* - US EPA) (EPA, 2008) e na União Europeia (EU, 2011). No Brasil, as

regulamentações para concentrações de HPAs estão descritas nas resoluções do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), de número 357/2005 para HPAs em águas (CONAMA, 2005) e 454/2012 para HPAs em sedimento (CONAMA, 2012) (Figura 3).

Figura 3. Nome e estrutura química dos HPAs listados e frequentemente monitorados de acordo com as recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), da União Europeia (EU) e do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) resoluções número 357/2005 (CON357) e 454/2012 (CON454). Em destaque: fenantreno, fluoreno e pireno, HPAs utilizados nos Capítulos 2 e 3 deste estudo.

Listados	Nome HPA	Estrutura Química	Listados	Nome HPA	Estrutura Química
EPA, CON454	Acenafteno		EU	Dibenzo[a,e]pireno	
EPA, CON454	Acenaftileno		EU	Dibenzo[a,h]pireno	
EPA, CON454	Antraceno		EU	Dibenzo[a,i]pireno	
EPA, EU, CON357, CON454	Benzo[a]antraceno		EU	Dibenzo[a,i]pireno	
EPA, EU, CON357	Benzo[b]fluoranteno		EPA, CON454	Fenantreno	
EU	Benzo[j]fluoranteno		EPA, CON454	Fluoranteno	
EPA, EU, CON357	Benzo[k]fluoranteno		EPA, CON454	Fluoreno	
EU	Benzo[c]fluoreno		EPA, EU, CON357	Indeno[1,2,3-cd]pireno	
EPA, EU	Benzo[g,h,i]perileno		EPA	5-Metilcriseno	
EPA, EU, CON357, CON454	Benzo[a]pireno		CON454	2-Metilnaftaleno	
EPA, EU, CON357, CON454	Criseno		EPA, CON454	Naftaleno	
EPA, EU, CON357, CON454	Dibenzo[a,h]antraceno		EPA, CON454	Pireno	

Fonte: EU, 2011 (Adaptada).

1.3.7. Metabolismo de biotransformação dos HPAs

Após a entrada dos HPAs na célula, sua metabolização ocorre a partir da ativação de enzimas específicas que participam das reações de biotransformação.

O processo de biotransformação dos HPAs ocorre basicamente em duas fases. A fase I envolve enzimas como as do complexo citocromo P450 (CYPs), Epóxido hidrolases (EH) e NAD(P)H quinona oxidoreduases (NQO1), que participam do primeiro processo de ativação dos HPAs, catalisando múltiplas reações e gerando metabólitos de natureza eletrofílica, como fenóis, quinonas, dióis e epóxidos e diol epóxidos (OMIECINSKI et al., 2011; STRAIF et al., 2005). Metabólitos intermediários como os epóxidos (gerados a partir da mono-oxigenação de alguns HPAs por enzimas do complexo Citocromo P450), após serem convertidos a dióis pela enzima EH, ainda podem ser convertidos por citocromos a diolepóxidos, uma classe de metabólitos de HPAs altamente carcinogênicos (STRAIF et al., 2005). Esses metabólitos gerados, além de apresentarem características carcinogênicas e/ou tóxicas, ainda não são hidrossolúveis o suficiente para serem excretados da célula (ABDEL-SHAFFY; MANSOUR, 2016). Em função disso, precisam ser conjugados com outras moléculas. Esse processo de conjugação é catalisado pelas enzimas de biotransformação de fase II, como as Glutathione S-transferases (GSTs), UDP-glucuronosiltransferases (UDPGTs) e Sulfotransferases (SULTs) (AMBROSONE; TANG, 2009).

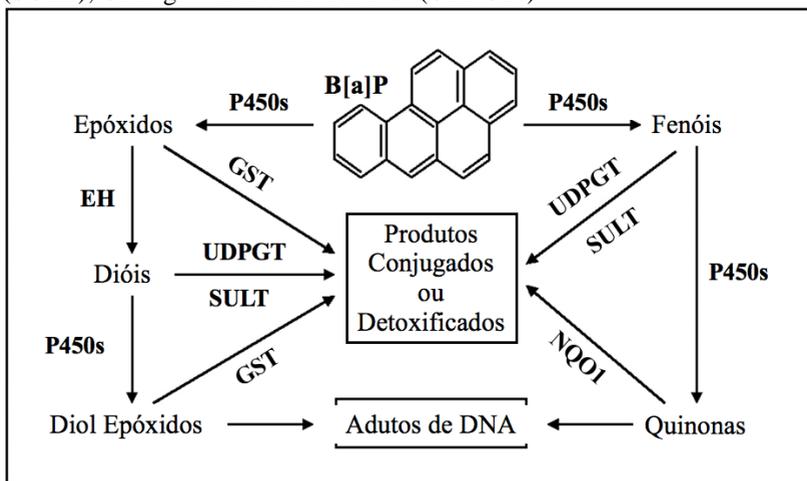
Um aumento na concentração celular dos metabólitos de HPAs ativados pelas enzimas de fase I, aliado à baixa detoxificação e conjugação das enzimas de fase II podem contribuir para altos níveis de metabólitos carcinogênicos reativos, que podem se ligar ao DNA, formando adutos de DNA e, se não removidos pelas enzimas de reparação, podem causar mutações e/ou erros na replicação do DNA, estimulando a formação de tumores, danos no desenvolvimento embrionário e malformações (AMBROSONE; TANG, 2009; ARMSTRONG et al., 2004; BERNARDO et al., 2016).

Um esquema simplificado das reações de fase I e II que envolvem a metabolização dos HPAs pode ser observado na Figura 4, no metabolismo do Benzo[a]pireno (B[a]P), composto modelo em estudos de carcinogenicidade de HPAs.

Após o processo de biotransformação (fases I e II), os metabólitos de HPAs, agora mais hidrossolúveis, podem ser transportados para o meio extracelular no metabolismo de fase III, por proteínas de membrana

componentes do sistema de resistência a múltiplos xenobióticos (*multixenobiotic resistance* – MXR) (LUCKENBACH; EPEL, 2008).

Figura 4. Esquema simplificado das reações de fase I e II de biotransformação envolvidas na metabolização dos HPAs, exemplificado através da metabolização do Benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), composto modelo em estudos de carcinogenicidade de HPAs. Enzimas de fase I: Citocromo P450 (P450s); Epóxido hidrolase (EH); NAD(P)H quinona oxidoreductase (NQO1) e enzimas de fase II: Glutaciona *S*-transferase (GST); Sulfotransferase (SULT); UDP-glucuronosiltransferase (UDPGTs).



Fonte: AMBROSONE; TANG, 2009 (Adaptada).

1.3.8. Estresse oxidativo causado por HPAs

O processo de biotransformação dos HPAs pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar a um quadro de estresse oxidativo celular, quando há um desequilíbrio entre a produção e remoção ou eliminação desses compostos (KELLY, 2003). A formação de EROs, tais como o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), e sua reação com diferentes compostos celulares podem causar lesões oxidativas das membranas lipídicas e proteínas, além de alterações no DNA, dando início a um processo degenerativo celular (GRINTZALIS; GEORGIU; DAILIANIS, 2012; NOH et al., 2015; STOREY, 1996). No entanto, o organismo é dotado de eficientes mecanismos de defesa celular compostos por complexos enzimáticos e não enzimáticos capazes de metabolizar e inativar a ação

tóxica dos EROs e mantê-los em níveis intracelulares mínimos, evitando um quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Como exemplo dessas enzimas, estão as antioxidantes: a Superóxido Dismutase (SOD), que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio; a Catalase (CAT), que decompõem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; e a Glutathione Peroxidase (GPx), que remove o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos, utilizando glutathione como co-substrato doador de elétrons. Além dessas, fazem parte do sistema antioxidante as enzimas auxiliares, tais como, a Glutathione Redutase (GR), que catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH) e a Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), que fornece a nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como equivalente redutor necessário na conversão de GSSG em GSH (CIRCU; AW, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; STOREY, 1996).

1.3.9. Fenantreno, fluoreno e pireno

Fenantreno

O fenantreno (PHE) é um HPA composto por três anéis benzênicos (BRUYN et al., 2012) que apresenta uma “região de baía” em sua conformação. Não é classificado como um composto carcinogênico, apesar da presença dessas regiões de baía que são regiões altamente reativas, consideradas estruturais para a formação de diolépóxidos em HPAs altamente carcinogênicos, como o B[a]P (ZHONG et al., 2011; LOTZ et al., 2016). Por conta dessa característica, o fenantreno vem sendo utilizado como modelo em estudos de HPAs (MOODY et al., 2001; NING et al., 2010). É o segundo HPA mais abundante na maioria dos diferentes tipos de petróleo (KERR et al., 1999), além de ser utilizado na fabricação de resinas e pesticidas (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015). Características neurotóxicas (BARRON et al., 2004); teratogênicas (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004); genotóxicas (OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2007); citotóxicas (SCHIRMER et al., 1998) e mutagênicas (WAHIDULLA; RAJAMANICKAM, 2010) são relatadas em peixes expostos ao fenantreno. Trabalhos recentes, realizados com a exposição de peixes ao fenantreno, demonstraram alterações no sistema endócrino e reprodutivo destes animais (HAN et al., 2010); estresse oxidativo (SUN et al., 2006; YIN et al., 2007) e danos no DNA (OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2007; MACHADO et al., 2014). Em moluscos bivalves, a exposição ao fenantreno pode causar danos oxidativos (HANNAM et al., 2009; LÜCHMANN et al., 2014; PIAZZA

et al., 2016), danos lipídicos (PIAZZA et al., 2016) e inibição da função imune hemocítica (HANNAM et al., 2009).

Fluoreno

O fluoreno (FLU) é o terceiro HPA mais abundante na maioria dos diferentes tipos de petróleos, depois do naftaleno e do fenantreno (FITILIS et al., 2007; KERR et al., 1999). Além de estar presente no petróleo, é um composto amplamente utilizado na indústria farmacêutica e na produção de pigmentos, corantes, pesticidas e plásticos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015). Em função disso, é um HPA comumente identificado na atmosfera, ambientes aquáticos e sedimentos de ambientes marinhos e de água doce (ALEGBELEYE; OPEOLU; JACKSON, 2017; CASELLAS et al., 1995; 1997; FERNANDEZ et al., 1992; GRIFOLL; SOLANAS, BAYONA, 1992; MUANGCHINDA et al., 2017; PALOLUOGLU et al., 2013).

Na literatura existem poucos estudos com enfoque na exposição e efeitos isolados do fluoreno em organismos aquáticos. Em peixes *Mugil cephalus* foi observado um aumento dos níveis de cortisol e glicose no plasma de animais expostos ao fluoreno (10; 100 e 750 µg/L) (THOMAS; WOFFORD; NEFF, 1981). Em exposição crônica ao fluoreno (29,6 µg/L), Sinaei (2013) encontrou aumento da hemólise de eritrócitos em peixes-anfíbio (*Boleophthalmus* sp). Após exposição ao fluoreno foram observadas menores taxas de sobrevivência (0,5 e 1,0 mg/L) e crescimento (0,25; 0,5 e 1,0 mg/L), alterações no padrão natatório e na capacidade alimentar e predatória (0,12 mg/L) de peixes, além de redução na taxa reprodutiva de *Daphnia magna* (0,125 mg/L) e inibição da produção de algas verdes *Selanastrum capricornutum* (3,0 mg/L) (FINGER et al., 1985). Em bivalves, por sua vez, respostas de exposição isolada do fluoreno ainda são desconhecidas.

Pireno

O pireno (PIR) é um HPA composto por quatro anéis benzênicos, encontrado principalmente em ambientes aquáticos e terrestres. Sua presença está associada a atividades antropogênicas como a combustão incompleta de combustíveis fósseis e a produção industrial de pigmentos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015; GUO et al., 2007; SERESHK; BAKHTIARI, 2014; YANCHESHMEH et al., 2014). Representa uma grande parte dos HPAs encontrados em ambientes aquáticos contaminados (LUO et al., 2006; OLIVEIRA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2012; XU et al., 2007) e vem sendo amplamente

utilizado como indicador de contaminação por HPAs no monitoramento de resíduos aquáticos (DISSANAYAKE; BAMBER, 2010; ZHANG et al., 2004).

Embora menos tóxico do que alguns HPAs, como o carcinogênico benzo[*a*]pireno, o pireno é um composto modelo em estudos de degradação biológica e metabolização de HPAs devido à sua oxidação relativamente simples (BEACH et al., 2010; RAVELET et al., 2000) e devido ao fato de sua estrutura estar presente nas moléculas desses HPAs carcinogênicos (MERSCH-SUNDERMANN; MOCHAYEDI; KEVEKORDES, 1992). Em decorrência de sua natureza lipofílica, o pireno pode ser acumulado nos tecidos (LIU et al., 2009) e exercer potencialmente efeitos adversos à saúde dos organismos aquáticos. Alterações nos hormônios tireoidianos de peixes *Cyprinus carpio* foram observadas após exposição crônica ao pireno (100 µg/L) (SHIRDEL et al., 2016). Em trutas *Oncorhynchus mykiss* a exposição ao pireno (25 µg/L e 100 µg/L) afetou a transcrição de genes relacionados à resposta imune, via glicolítica e metabolismo iônico dos peixes (KRASNOV et al., 2005). Em peixes *Pomatoschistus micros* a exposição ao pireno (0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/L) ocasionou um aumento de mortalidade, diminuição da performance natatória, danos lipídicos no fígado e brânquias e variações nas respostas de enzimas antioxidantes (OLIVEIRA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2012).

Em invertebrados, alterações nas taxas de alimentação e reprodução foram observadas em copépodes *Calanus* sp. após exposição ao pireno (100 nM) (JENSEN; NIELSEN; DAHLLÖF, 2008). Na ostra perliífera *Pinctada martensii*, após a exposição ao pireno (de 8 a 64 µg/L), foram observados efeitos na resposta imune e estresse oxidativo, como a diminuição do número de hemócitos, alteração na atividade fagocítica, aumento da peroxidação lipídica e decréscimo da glutatona total (GSHT) na hemolinfa (XIE et al., 2017).

1.3.10. Biomarcadores de contaminação aquática

A atividade da aquicultura é fundamentalmente dependente da qualidade da água dos locais em que está inserida. Com fins de consumo humano, a prática do cultivo e engorda dos organismos aquáticos exigem águas isentas de contaminação, tornando a preservação ambiental uma medida imprescindível para a realização desta atividade.

Com a finalidade de monitorar a qualidade da água e sanidade dos organismos, e avaliar respostas biológicas e efeitos tóxicos causados

pela presença dos contaminantes, diversas ferramentas podem ser aplicadas, dentre as quais se destacam os biomarcadores. Os biomarcadores são, de modo geral, caracterizados como alterações biológicas em nível molecular, celular e fisiológico que podem demonstrar efeitos tóxicos causados pelos poluentes (WALKER et al., 1996). Podem, no entanto, ser classificados em: biomarcadores de exposição; biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade (TIMBRELL, 1998).

Os biomarcadores de exposição estimam respostas quantitativas e qualitativas da exposição aos compostos (SCHLENK, 1999). São respostas iniciais, observadas em níveis primários após a exposição, como transcrição gênica ou indução dos sistemas de defesa celular (enzimas de biotransformação de xenobióticos, metalotioneínas, defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas) (CAJARAVILLE et al., 2000).

No caso de falhas ou sobrecarga nesses processos de defesa causadas pela exposição ao xenobiótico, danos celulares; histológicos e/ou fisiológicos podem ocorrer, causando prejuízos reversíveis ou permanentes ao animal. Quando permanentes ou decorrentes em períodos vulneráveis do ciclo de vida; o desenvolvimento, a reprodução e sobrevivência podem ser afetados, eventualmente levando a prejuízos em níveis maiores de organização biológica (em nível de população, comunidade, ecossistema) (SCHLENK, 1999).

Desta forma, quando esses danos representam os efeitos do estresse e a magnitude das alterações causados por determinado xenobiótico, estas respostas podem ser consideradas como biomarcadores de efeito (por exemplo: danos de DNA, de oxidação de proteínas e lipídios; danos histológicos; formação de micronúcleos, entre outros) (NORDBERG, 2010).

Contudo, alguns fatores como a predisposição genética e outros fatores externos, tais como variações de idade, alimentação e estilo de vida são capazes de influenciar a susceptibilidade dos indivíduos expostos a determinados contaminantes. Para isso, os biomarcadores de susceptibilidade refletem os fatores genéticos ou adquiridos que venham a influenciar as respostas dos indivíduos quando expostos a um determinado xenobiótico (AMORIM, 2003; IAVICOLI; LESO; SCHULTE, 2016).

Existem inúmeras vantagens no uso de biomarcadores de contaminação aquática. Podem ser analisados tanto em populações selvagens pertencentes aos habitats contaminados, quanto em organismos experimentalmente expostos aos poluentes, a fim de indicar a exposição a produtos químicos tóxicos, e/ou a magnitude da resposta ao xenobiótico

(MCCARTHY; SHUGART, 1990). Quando utilizados em conjunto com análises químicas de contaminantes bioconcentrados em tecidos do organismo, é possível obter informações mais completas e biologicamente mais relevantes em se tratando das respostas e do impacto dos xenobióticos sobre a saúde dos organismos (VAN DER OOST et al., 1996). Além disso, o uso de biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares possibilita a percepção antecipada de mudanças em níveis maiores de organização biológica, quando a resposta é ativada muito rapidamente pelo organismo modelo - ou biomonitor - e leva poucas horas ou dias para se manifestar. Isto permite a percepção do problema e o estabelecimento de estratégias de remediação, antes que danos irreversíveis ao ambiente aconteçam (CAJARAVILLE et al., 2000; DEPLEDGE; FOSSI, 1994).

Há facilidades no uso dos moluscos bivalves em estudos de biomarcadores de contaminação aquática, uma vez que estes são animais sésseis, filtradores e cosmopolitas (LAM, 2009). Em estudos com biomarcadores bioquímicos e moleculares, os bivalves vêm sendo frequentemente utilizados como organismos biomonitores, conforme observado nas recentes publicações com ostras (BACHÈRE et al., 2017; GUEGUEN et al., 2017; SHENAI-TIRODKAR et al., 2017; TRAN et al., 2017; ZACCHI et al., 2017); mexilhões (COCCI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; ROBERTSON et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; VASANTHI et al., 2017); vieiras (GERAUDIE et al., 2016; HU et al., 2015a; 2015b; PIAZZA et al., 2016) e moluscos de areia (ALMEIDA et al., 2017a; 2017b; MARISA et al., 2016; MOHAMED et al., 2017). Embora muitos trabalhos venham sendo desenvolvidos, para que sejam efetivos em estudos de biomonitoramento e proteção ambiental, há a necessidade de realização de estudos frequentes na busca por biomarcadores sensíveis que sejam espécie-específicos e que possuam especificidade para a ampla gama de xenobióticos encontrados nos ambientes aquáticos.

1.4. Objetivos e considerações sobre a estrutura do texto

1.4.1. Objetivo geral

Avaliar respostas moleculares e de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea brasiliana* expostas a diferentes salinidades e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

1.4.2. Objetivos específicos

- Avaliar as respostas transcricionais de genes relacionados com o sistema de biotransformação, de estresse oxidativo e metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos em *C. brasiliana* expostas a três diferentes salinidades e fenantreno, após dois períodos de exposição (24 h e 96 h);
- Verificar o consumo e depleção de fenantreno na água dos aquários de exposição em diferentes salinidades;
- Quantificar a bioconcentração de fenantreno em tecidos moles de *C. brasiliana* antes e após a exposição;
- Analisar as respostas de genes e enzimas de biotransformação de fase I e II em *C. brasiliana* expostas a duas doses de pireno e fluoreno, em dois períodos de exposição;
- Verificar o consumo e depleção de pireno e fluoreno na água dos aquários de exposição (24 h e 96 h);
- Mensurar a bioconcentração de pireno e fluoreno em tecidos moles de *C. brasiliana* antes e após 24 h e 96 h de exposição;
- Contribuir na busca de potenciais biomarcadores moleculares e bioquímicos de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

CAPÍTULO 2

2. VARIAÇÕES TRANSCRICIONAIS EM OSTRAS *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) EXPOSTAS AO FENANTRENO EM DIFERENTES SALINIDADES.

*Flávia Lucena Zacchi*¹; *Daína de Lima*¹; *Fabrcio Flores-Nunes*¹; *Jacó Joaquim Mattos*²; *Karim Hahn Lüchmann*³; *Carlos Henrique Araújo de Miranda Gomes*⁴; *Márcia Caruso Bicego*⁵; *Satie Taniguchi*⁵; *Silvio Tarou Sasaki*⁵; *Afonso Celso Dias Bainy*¹

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica - LABCAI, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

²Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola - NEPAq, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular - LBBM, Universidade do Estado de Santa Catarina - Udesc, Laguna, SC, Brasil.

⁴Laboratório de Moluscos Marinhos - LMM, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

⁵Laboratório de Química Orgânica Marinha - LABQOM, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.

Capítulo publicado na revista **Aquatic Toxicology** em 2017:

Zacchi, F.L., Lima, D., Flores-Nunes, F.F., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Gomes, C.H.A.M., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bainy, A.C.D., 2017. **Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene at different salinities.** *Aquat. Toxicol.*, 183, 94-103.

doi: <http://dx.doi.org/10.2016/j.aquatox.2016.12.016>

2.1. Resumo

Animais eurialinos de estuários, como a ostra *Crassostrea brasiliana*, apresentam mecanismos fisiológicos de adaptação para tolerância às mudanças de salinidade. Estes ecossistemas recebem constantemente xenobióticos provenientes de áreas urbanas adjacentes, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como o fenantreno (PHE). Com o objetivo de entender a influência da salinidade nas respostas moleculares de *C. brasiliana* expostas ao PHE, ostras foram aclimatadas a diferentes salinidades (35, 25 e 10) por 15 dias e então, expostas a 100 µg.L⁻¹ de PHE por 24 h e 96 h. Os grupos controle foram mantidos às mesmas salinidades, sem a adição de PHE. Foram realizadas análises químicas dos tecidos moles das ostras e as brânquias foram separadas para a quantificação dos níveis de transcritos por qPCR. Os níveis de transcritos de diferentes genes foram avaliados. Entre eles estavam genes envolvidos em vias de estresse oxidativo, fases I e II do sistema de biotransformação de xenobióticos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácidos graxos e gene putativo do receptor nuclear translocador de aril hidrocarboneto. Maiores níveis de transcritos foram observados para o gene da *SULT-like* em ostras expostas ao PHE em salinidade 10 comparadas ao controle (24 h e 96 h). Os níveis de transcritos das isoformas de citocromo P450 *CYP2A1* e *CYP2-like1* apresentaram-se mais elevados em ostras expostas por 24 h e *CYP2-like2* por 96 h em ostras expostas ao PHE em salinidade 10 comparadas aos grupos controle. Estes resultados podem estar associados a um maior requerimento de detoxificação do PHE em condições de estresse hiposmótico. Os maiores níveis de transcritos de *CAT-like*, *SOD-like*, *GSTm-like* (96 h) e *GSTΩ-like* (24 h) em salinidade 10 comparada com salinidade 25 e/ou 35 estão possivelmente relacionados ao aumento da produção de EROs. A transcrição destes genes não foi afetada pela exposição ao PHE. Os genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos: *GAD-like* (24 h), *GLYT-like*, *ARG-like* (96 h) e *TAUT-like* (24 h e 96 h) também apresentaram diferenças entre altas e baixas salinidades, e não foram afetados pelos níveis de PHE, indicando que estes genes podem estar envolvidos no mecanismo de adaptação das ostras às mudanças de salinidade, através do ajuste da osmolaridade intracelular.

Palavras-chave: estuários, ostra do mangue, HPAs, fenantreno, qPCR, salinidade.

2.2. Abstract

Euryhaline animals from estuaries, such as the oyster *Crassostrea brasiliana*, show physiological mechanisms of adaptation to tolerate salinity changes. These ecosystems receive constant input of xenobiotics from urban areas, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as phenanthrene (PHE). In order to understand the influence of salinity on the molecular responses of *C. brasiliana* exposed to PHE, oysters were acclimatized to different salinities (35, 25 and 10) for 15 days and then exposed to 100 g.L⁻¹ PHE for 24 h and 96 h. Control groups were kept at the same salinities without PHE. Oysters were sampled for chemical analysis and the gills were excised for mRNA quantification by qPCR. Transcript levels of different genes were measured, including some involved in oxidative stress pathways, phases I and II of the xenobiotic biotransformation systems, amino acid metabolism, fatty acid metabolism and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator putative gene. Higher transcript levels of *Sulfotransferase-like* gene (*SULT-like*) were observed in oysters exposed to PHE at salinity 10 compared to control (24 h and 96 h); cytochrome P450 isoforms (*CYP2AU1*, *CYP2-like1*) were more elevated in oysters exposed for 24 h and *CYP2-like2* after 96 h of oysters exposed to PHE at salinity 10 compared to control. These results are probably associated to an enhanced Phase I biotransformation activity required for PHE detoxification under hyposmotic stress. Higher transcript levels of *CAT-like*, *SOD-like*, *GSTM-like* (96 h) and *GSTΩ-like* (24 h) in oysters kept at salinity 10 compared to organisms at salinities 25 and/or 35 are possibly related to enhanced ROS production. The transcription levels of these genes were not affected by PHE exposure. Amino acid metabolism-related genes (*GAD-like* (24 h), *GLYT-like*, *ARG-like* (96 h) and *TAUT-like* at 24 h and 96 h) also showed different transcription levels among organisms exposed to different salinities, indicating an important role for oyster salinity adaptation keeping its osmolarity, which is not affected by exposure to these levels of PHE.

Keywords: estuaries; mangrove oyster; PAHs; phenanthrene, qPCR; salinity.

2.3. Introdução

Os ecossistemas de estuários e manguezais estão entre os mais produtivos do mundo e caracterizam-se por flutuações diárias constantes de salinidade a partir de misturas de água doce e salgada. A salinidade é um fator importante e determinante na estruturação e caracterização da biota aquática destes ecossistemas (Elliot e McLusky, 2002). Os animais eurialinos, como os bivalves, possuem mecanismos fisiológicos de regulação da pressão osmótica para adaptação a estas mudanças de salinidade (Berger e Kharazova, 1997). Um destes mecanismos de regulação caracteriza-se pelo uso dos aminoácidos livres e íons inorgânicos, como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , como osmólitos intracelulares (Hosoi et al., 2007; Pierce et al., 1992). Ao longo das últimas décadas, o papel dos aminoácidos nos processos osmorregulatórios dos bivalves vem sendo amplamente estudado (Deaton, 2001; Kube et al., 2007; Matsushima et al., 1987; Powell et al., 1982; Shumway et al., 1977). Recentemente, estudos de genomas e transcriptomas vêm sendo desenvolvidos em bivalves sob condições de estresse osmótico, fornecendo evidências de que o metabolismo de aminoácidos está envolvido nas respostas a variações osmóticas, nestes animais (Meng et al., 2013; Zhao et al., 2012).

Somados à salinidade, os xenobióticos também são capazes de influenciar as respostas biológicas na biota aquática dos ecossistemas estuarinos. Estas áreas recebem constantemente resíduos derivados de atividades antrópicas como o turismo, habitações costeiras, embarcações e ineficiente tratamento do esgoto sanitário (Delgado et al., 2010; Kennish, 1992). Estes resíduos são constituídos de uma complexa mistura de compostos químicos, como o fenantreno (PHE). O fenantreno é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) de baixo peso molecular, formado por três anéis benzênicos (Bruyn et al., 2012). É um importante componente do óleo cru, comumente usado como substrato modelo em estudos que envolvem o metabolismo de HPAs, devido a sua alta hidrofobicidade e rápido acúmulo pelos organismos (Hannam et al., 2010). Embora não seja classificado como um composto mutagênico ou carcinogênico, o fenantreno possui regiões altamente reativas, como as “regiões de baías” e as “regiões-K”, onde, potencialmente, espécies carcinogênicas podem se formar (Ning et al., 2010). Além disso, mostrou-se tóxico em muitos organismos estuarinos, incluindo peixes (Machado et al., 2014), camarões (Unger et al., 2007), moluscos de areia (Dailianis et al., 2014) e ostras (Lüchmann et al., 2014).

Os organismos possuem um complexo sistema de biotransformação em que uma variedade de enzimas participa da

metabolização dos compostos orgânicos, como o fenantreno. Estes processos envolvem a criação de metabólitos mais polares e mais hidrofílicos, capazes de ser mais facilmente excretados. Na fase I do sistema de biotransformação, os xenobióticos podem ser monooxigenados pelo complexo de enzimas citocromo P450 (CYPs) e, na fase II, estes metabólitos são normalmente conjugados a substratos endógenos por enzimas como as glutatona-S-transferases (GSTs) e as sulfotransferases (SULTs) (Hu et al., 2015). O fenantreno pode ainda interferir em outras vias metabólicas, gerando respostas celulares (Almeida et al., 2005; Machado et al., 2014; Zhang et al., 2014). Estas respostas podem levar ao estresse oxidativo, estabelecido quando o sistema de defesa antioxidante celular é sobreposto pela excessiva formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio molecular e singlet, radicais hidroxila e seus derivados (Ray et al., 2012). O estresse oxidativo pode afetar a homeostase celular, levando à peroxidação lipídica, oxidação proteica e danos no DNA. Para proteger o organismo contra estes efeitos deletérios, mecanismos enzimáticos e não enzimáticos estão envolvidos no sistema de defesa antioxidante das células (Halliwell e Gutteridge, 2007), como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (An and Choi, 2010; Kashiwagi et al., 1997). Estas respostas em nível molecular são amplamente estudadas em ostras (Flores-Nunes et al., 2015; Guo et al., 2011; Jo et al., 2008; Serrano et al., 2015; Wang et al., 2010).

A ostra do mangue *Crassostrea brasiliana* (sin. *Crassostrea gasar*, Lazoski et al., 2011) pode ser encontrada em substratos rochosos, manguezais e estuários ao longo da costa brasileira, desde o Nordeste (estado do Pará) até o Sul (estado de Santa Catarina) (Amaral e Simone, 2014). O uso de *C. brasiliana* como organismo sentinela em estudos de biomonitoramento tem se mostrado vantajoso, uma vez que esta espécie é sésil, filtradora e capaz de acumular contaminantes ambientais em seus tecidos, além de possuir ampla distribuição ao longo da costa brasileira (Lazoski et al., 2011; Lüchmann et al., 2011, 2014, 2015; Pie et al., 2006).

Estudos realizados recentemente em nosso laboratório identificaram potenciais biomarcadores de exposição em ostras *C. brasiliana* expostas a fenantreno e mantidas em locais contaminados por esgoto sanitário (Lüchmann et al., 2014; Pessatti et al., 2016). Entretanto, em condições de exposição a xenobióticos, o papel da salinidade nas respostas moleculares deve ser investigado para esta espécie.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da salinidade nas respostas moleculares de ostras *C. brasiliana* expostas ao fenantreno.

Para isto, os níveis de transcritos de genes relacionados ao estresse oxidativo, sistema de biotransformação de xenobióticos e metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos foram analisados.

2.4. Material e métodos

2.4.1. Animais e condições de exposição

Ostras *Crassostrea brasiliiana* adultas (6,0 – 7,0 cm) foram obtidas no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Sul do Brasil, onde estavam mantidas à salinidade 35. As ostras foram aleatoriamente distribuídas em três tanques de 100 litros (100 ostras por tanque) com salinidade 35. A aclimação foi realizada primeiramente com a diminuição gradual por sete dias da salinidade de 35 para 25 e depois para 10 em dois tanques, respectivamente. Uma vez que as salinidades experimentais foram atingidas nos três tanques (35, 25 e 10), as ostras foram aclimatadas por mais sete dias. Durante toda a aclimação, a alimentação foi realizada com dieta de microalgas contendo 2.10^5 células. mL⁻¹ de *Isochrysis galbana* (50%) e *Chaetoceros muelleri* (50%), diariamente. A temperatura foi mantida a 20°C, fotoperíodo de 12h : 12h e renovação diária total da água. Após o período de aclimação, as ostras foram distribuídas em dois aquários de exposição (40 litros de água, 40 animais por aquário) para cada salinidade. Os aquários com aeração individual foram cobertos com tampa de vidro e mantidos dentro de caixas plásticas individuais contendo filtros de vapores orgânicos, para evitar potenciais contaminações dos grupos controle.

O fenantreno (PHE) (P1140-9, 98% de pureza, Sigma-Aldrich), foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado aos aquários de exposição (um de cada salinidade experimental: F35, F25 e F10) até alcançar a concentração nominal de 100 µg.L⁻¹ (equivalente a 0,56 µM) e a concentração final máxima de DMSO de 0,002% (v/v). A concentração de PHE foi escolhida com base em estudos realizados com *C. brasiliiana* em nosso laboratório (Lüchmann et al., 2011, 2014) e também baseada na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - US EPA). Foi escolhida a concentração em que há a possibilidade de risco ou perigo aos animais e seres humanos em ambientes aquáticos.

Nos grupos controle (um por salinidade experimental: C35, C25 e C10), os animais foram submetidos às mesmas condições dos grupos de exposição, com a exceção da adição de 0,002% (v/v) de DMSO sem PHE.

Os animais foram mantidos a 24 h e 96 h de exposição e durante este período, as ostras pertencentes aos grupos controle e PHE não foram alimentadas. Foi realizada a renovação total diária da água, mantendo os animais nas mesmas condições.

No final dos tempos de exposição, dez animais de cada grupo foram dissecados e as brânquias foram removidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para a realização das análises moleculares. As brânquias foram escolhidas como tecido alvo por estarem em contato direto com o ambiente externo e por desempenharem um importante papel na osmorregulação (Deaton, 2001; Valdez Domingos et al., 2007; Zanette et al., 2011). Além disso, é um dos principais locais de bioconcentração de hidrocarbonetos em peixes (Shukla et al., 2007), e diferenças nos níveis de transcritos dos genes relacionados ao sistema de biotransformação de xenobióticos, como as isoformas de *GSTs* e *CYPs* foram encontradas em brânquias de *C. brasiliiana* expostas a PHE (Lüchmann et al., 2014, 2015).

Ao final do período de aclimação (salinidades 35, 25 e 10) e após 96 h de exposição (controles: C35, C25 e C10; e grupos expostos: F35, F25 e F10), dez ostras de cada aquário foram agrupadas para a realização das análises químicas de bioconcentração de PHE.

2.4.2. Concentração de PHE na água

A concentração de PHE na água de cada aquário controle ou exposto foi mensurada por fluorimetria durante as primeiras 24 h de exposição. A depleção de PHE foi avaliada em três aquários (salinidade 35, 25 e 10) contendo as mesmas condições dos grupos expostos, sem ostras. Um mL de água de cada aquário foi amostrado e imediatamente quantificado por leitura fluorimétrica (240 nm excitação / 360 nm emissão) em espectrofluorímetro (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e transformadas em concentração de PHE a partir de uma diluição seriada de 2 mg. L⁻¹ PHE como curva padrão de referência. As amostras foram coletadas a cada 15 min durante as primeiras 2 h; a cada 30 min durante as 2 h subsequentes; a cada hora durante as 8 h subsequentes e após 24 h. O consumo e a depleção do PHE nos aquários com ou sem ostras foi calculado baseado nas equações exponenciais e lineares, respectivamente.

2.4.3. Análise dos níveis de PHE nos tecidos de *C. brasiliiana*

As análises dos níveis de PHE nos tecidos de *C. brasiliiana* foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP). Amostras de 1 g de ostras liofilizadas (Thermo Savant, modulyoD lyophilizer, Waltham, MA, USA) foram extraídas, de acordo com MacLeod et al. (1985), com pequenas modificações, em soxhlet com n-hexano e diclorometano 50% (v/v). Previamente à extração, padrões internos (surrogate), naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, d₁₀-fenantreno, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂ foram adicionados às amostras, ao branco de amostra, e ao material de referência (SRM 2974a – Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue – *Mytilus edulis*). Após a extração, as amostras foram purificadas em coluna cromatográfica de sílica. Para a realização de uma purificação complementar, as amostras foram injetadas em HPLC com duas colunas de exclusão. As amostras foram concentradas e o padrão interno benzo(b)fluoranteno-d₁₂ foi adicionado. O extrato foi injetado em um cromatógrafo gasoso equipado com um espectrômetro de massa (GC/MS) (6890/5973, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com o modo de aquisição SIM (*Selective Ion Monitoring*). A identificação do HPA foi feita a partir da comparação dos tempos de retenção com os padrões de referência e a quantificação foi calculada através da razão entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas de calibração ajustadas por ao menos cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

2.4.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa

O RNA total das brânquias foi isolado com o uso do reagente Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Cem miligramas de brânquias foram adicionados a 1 mL de Qiazol e rapidamente homogeneizados em Tissue-Tearor (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). A concentração e pureza do RNA total extraído foram verificadas em Espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Termo Scientific, Wilmington, DE, USA). Para cada amostra, 1 µg de RNA total foi tratado com DNase e submetido à reação de transcrição reversa com o uso do kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen). As amostras foram diluídas e armazenadas a -20° C. Para as reações de PCR quantitativo (qPCR) foi utilizado o kit QuantiFast SYBR Green PCR

(Qiagen) e foram utilizados 100 ng de cDNA de cada amostra e 1 μ M de cada iniciador em um volume final de reação de 20 μ L.

2.4.5. Reações de qPCR e análises estatísticas

As sequências nucleotídicas foram selecionadas a partir da base de dados gerada pela análise do transcriptoma de brânquias e glândulas digestivas de *C. brasiliensis* (Lüchmann et al., 2015). Os iniciadores usados nas reações de qPCR foram desenhados com o auxílio do *software* Primer Quest, disponível em www.idtdna.com (IDT), seguindo os parâmetros: (a) *primer size*: mínimo (mín) 18, ótimo (opt) 24 e máximo (máx) 28; (b) *primer Tm*: 55 (mín), 60 (opt), 65 (máx); (c) *primer GC%*: 45 (mín), 50 (opt), e 55 (máx); (d) *amplicon size*: 80 (mín), 130 (opt), 200 (max); aceitando máximo de diferença de *Tm* (*Max Tm difference*) de um grau Celsius. Os genes selecionados e seus respectivos pares de iniciadores estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Genes selecionados e suas respectivas funções, sequências de iniciadores e tamanhos de amplicon.

Simbolo	Nome do Gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Função biológica
Genes de interesse				
<i>ARNT-like</i>	<i>Receptor nuclear translocador de áril hidrocarbonetos</i>	F - CGT CTG ATT GAT GCC CGA AGT AAA T R - TCT GTC TGG TTT GAC ACA CCT CTA	82	Metabolismo de xenobióticos
<i>ARG-like</i>	<i>Arginase</i>	F - ATG TGT TTG ATG CTG GTA TGC CCT TT R - ACC TCT GTG TAA GCC TCC AAT CCA TAT T	94	Metabolismo de aminoácidos
<i>CAT-like</i>	<i>Catalase</i>	F - TAC AAC CAC ATC GAG GAC GGG AAG R - TCC TTC TGG GAC CAT ACC TTG GTG	151	Enzima antioxidante
<i>CYP2A1</i>	<i>Citocromo P450 2A1</i>	F - AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC R - TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA	158	Biotransformação de xenobióticos - fase I
<i>CYP2-like1</i>	<i>Citocromo P450 família 2</i>	F - TCG TGC TCC TTT ACG AGT TGA CGA R - ATA TGC CGG GAG ATC CAT GTC GAA	91	Biotransformação de xenobióticos - fase I
<i>CYP2-like2</i>	<i>Citocromo P450 família 2</i>	F - CGC TTC GCA GTC CAA GTT GAC AAA R - ATC GTG TTT GGG TTC AGG TAT GCG	136	Biotransformação de xenobióticos - fase I
<i>CYP356A1-like</i>	<i>Citocromo P450 - 356A1</i>	F - TGT TCA GGC CCA ACA ACT CTG TCA R - GGG AGT GGA CTC ACC CAG ATT CAC AA	114	Biotransformação de xenobióticos - fase I

Continuação...

Simbolo	Nome do Gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Função biológica
Genes de interesse				
<i>FABP-like</i>	<i>Proteína ligante de ácidos graxos</i>	F - ACG TGA ACG ACG ATG ACC ACA AGT R - TGG TGT TGT CCT TGG ATT TAC CGT CC	105	Proteína transportadora de ácidos graxos
<i>GAD-like</i>	<i>Glutamato descarboxilase</i>	F - GGA GTT TCA GTG TCC TAA CAT TTG CTT T R - CAA TCG TTG CTA TAT CCT TCC ACC ATT C	102	Metabolismo de aminoácidos
<i>GLYT-like</i>	<i>Transportador de glicina dependente de Na e Cl</i>	F - GGC AGT AGT CAG AGC AGT CTA CAA R - GAC GGC ATA TCC AAT ACA CGA CAA C	102	Metabolismo de aminoácidos
<i>GPx-like</i>	<i>Glutaciona peroxidase</i>	F - CGTTGGCGCCA TTGACCTCTATCT R - ACCAGTTTGGAAATCAGGAGCCAG	144	Enzima antioxidante
<i>GSTO-like</i>	<i>Glutaciona-S-transferase ômega</i>	F - ATT GGC ACA CGT ACC TCG TCT GAT R - TTA ATG GGA CCG CCA GAA GGT CAT	175	Biotransformação de xenobióticos - fase II
<i>GSTM-like</i>	<i>Glutaciona-S-transferase microsomal</i>	F - GCA TTG TCT GGT GTG GTT TGG TGT R - CCT GAG AGT ATG ATG CAG CTT GCA GA	198	Biotransformação de xenobióticos - fase II
<i>SOD-like</i>	<i>Superóxido dismutase Cu-Zn</i>	F - GCT CCA GAG GAT ACT GAG AGG CAT R - CCA ATG ATG GAT TGA GGA CCA GCA	124	Enzima antioxidante

Continuação...

Simbolo	Nome do Gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Função biológica
Genes de interesse				
<i>SULT-like</i>	<i>Sulfotransferase 1C4</i>	F - CAC CTG ITA CCT CGC CAT ACT CCA R - ACT ACC ATG TCC TTC ATC AGG TCC C	149	Biotransformação de xenobióticos - fase II
<i>TAUT-like</i>	<i>Transportador de taurina</i>	F - CCC AAA CTG ATG GAG TAG GAG AAG AAG A R - GTA ACA CTT GAA GGT GCT CAG GAA GG	128	Metabolismo de aminoácidos
Genes normalizadores usados				
<i>40S_s3-like</i>	<i>Ribossomal Subunidade 40 proteína s3</i>	F - CCT GTT ATG GAG TGC TAC GGT TTA TC R - CAT TGA CTT GGC TCT CTG TCC TC	98	Proteína de RNA ribossomal
<i>40S_s9-like</i>	<i>Ribossomal Subunidade 40 proteína s9</i>	F - CCT GTT CCC TTC TTG GCA TTC TT R - TGA CTT CTC CCT CAG ATC ACC ATA C	78	Proteína de RNA ribossomal
Genes normalizadores testados				
<i>28S-like</i>	<i>Ribossomal Subunidade 28</i>	F - CCC GAA GCC AAA CAC ATT CAA GTG G R - GGC TTT CCA TTG CCG TCA CCT TAG	131	Proteína de RNA ribossomal
<i>βACT-like</i>	<i>β-Actina</i>	F - TTG GTG ACG ATG CCG TGT TCA ATG G R - CCC AGA CAT CAG GGT GTT ATG GTT GGT ATG	122	Proteína do citoesqueleto

Continuação...

Símbolo	Nome do Gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Função biológica
Genes normalizadores testados				
<i>αTUB-like</i>	<i>α-Tubulina</i>	F - TGA GGC CCG TGA AGA TCT TGC TGC R - ACC ACC CTC CTC TTC AGC TTC ACC T	91	Proteína do citoesqueleto
<i>βTUB-like</i>	<i>β-Tubulina</i>	F - GGG CTA AGG GAC ACT ACA CAG AAG GAG C R - TGT TCC CAT ACC AGA TCC GGT GCC A	146	Proteína do citoesqueleto
<i>ANK-like</i>	<i>Anquirina</i>	F - CAT TGG TCG TCC TAT TGA ACA ATC TAA A R - AAG TGA TAA AGG TAA TTC TCA CAC AAC C	84	Proteína do citoesqueleto
<i>EFlα-like</i>	<i>Fator de Elongação-1-α</i>	F - ATT GAC CAG AGA ACC ATC GCC AAG T R - ACG CTC AGC CTT GAG TTT GTC CAA TA	102	Síntese proteica
<i>GAPDH-like</i>	<i>Gliceraldeído 3-<i>fosfato desidrogenase</i></i>	F - CAG TCC TTG TTA CTG GGT CCA TCT AC R - TGT CTA GCT CCT CTT GCG AAA GTT ATT C	122	Via glicolítica

Os níveis de transcritos dos genes selecionados foram analisados nas brânquias das ostras, por qPCR, em termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para assegurar a ausência de produtos não específicos e dímeros, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%. A eficiência do qPCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores a partir de uma curva de calibração de cDNA, preparada a partir de uma diluição seriada (400 ng/reacção; 200 ng/reacção; 100 ng/reacção; 50 ng/reacção e 25 ng/reacção). Para as análises, foram utilizados os genes em que as curvas apresentaram um R^2 maior ou igual a 0,99 e eficiência entre 98% e 100%. Para testar e escolher os genes de referência foi utilizado o método 2^{-Cq} (Schmittgen e Livak, 2008). Para garantir maior robustez na normalização dos dados, foram testados nove genes de referência: *Ribossomal 40S proteína s3-like (40S_s3-like)*; *Ribossomal 40S proteína s9-like (40S_s9-like)*; *Ribossomal 28S-like (28S-like)*; *α Actina-like (α ACT-like)*; *α Tubulina-like (α TUB-like)*; *β Tubulina-like (β TUB-like)*; *Anquirina-like (ANK-like)*; *Fator de alongação 1 α -like (EF-1 α -like)*; *Gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase-like (GAPDH-like)* (Figura Suplementar 1). Dois genes foram utilizados para a normalização dos dados (*40S_s3-like*, *40S_s9-like*) e a média geométrica dos valores de Ct destes dois genes foi calculada. Para os genes de interesse, foi aplicado o método $2^{-\Delta Cq}$ (Schmittgen e Livak, 2008). Todos os dados foram relativizados pelo grupo C35 – salinidade em que os animais eram mantidos antes do experimento

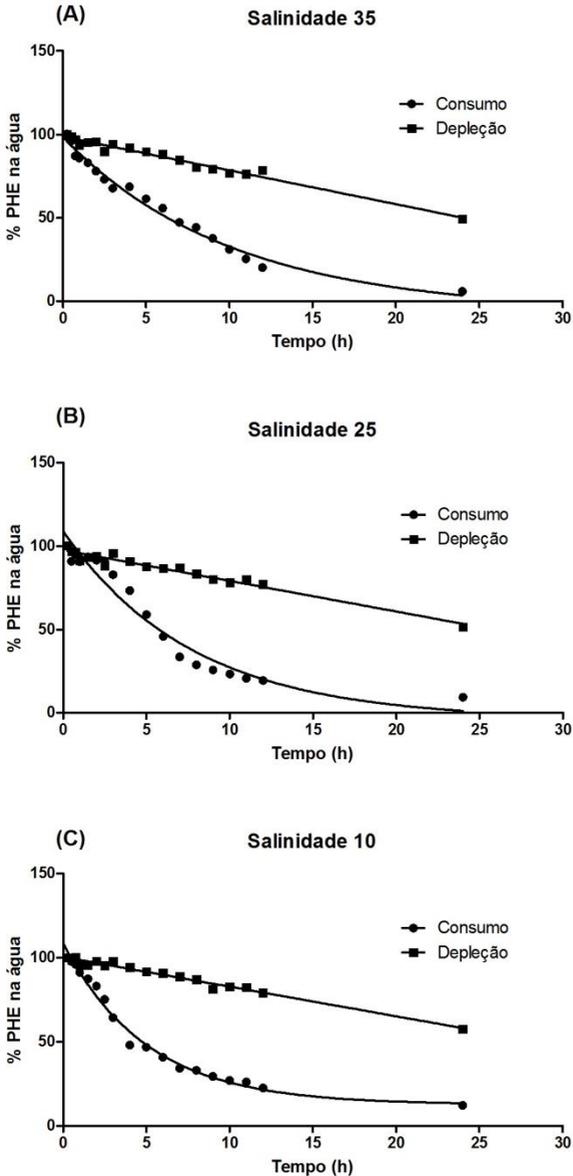
A fim de detectar os *outliers* o teste de Grubb foi aplicado, e a normalidade e homocedasticidade dos dados foram avaliadas através dos testes de D'Agostino e Pearson e Levene, respectivamente. Para testar os efeitos do PHE e da salinidade nos parâmetros moleculares, foram realizadas análises de variância de duas vias (2-way ANOVA). Quando encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros moleculares das ostras expostas ao PHE ou mantidas a salinidades distintas, foi aplicado o pós-teste de Tukey para determinar as diferenças estatísticas entre as médias. Para comparar os níveis de PHE acumulados nos tecidos das ostras foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn entre os grupos controles e expostos (PHE). As diferenças estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas com o auxílio dos softwares Statistica 7 e GraphPad Prism 5.0.

2.5. Resultados e discussão

2.5.1. Níveis de PHE na água e nos tecidos de ostras mantidas a diferentes salinidades

Após 24 h, os níveis de PHE na água dos aquários com ostras, em salinidade 35, 25 e 10, diminuíram de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $4,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (6%), para $7,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (9%) e para $9,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (12%), respectivamente, indicando que houve bioconcentração deste composto pelos animais. Entretanto, os aquários mantidos sem ostras também apresentaram decréscimo nos níveis de PHE na água: $36,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ (49%), $40,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (52%) e $44,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (58%) nas salinidades 35, 25 e 10, respectivamente (Figura 1). Esses resultados indicam que há uma considerável depleção de PHE na água, não associada ao consumo das ostras. A solubilidade do PHE é menor em soluções salinas (Eganhouse e Calder, 1976; Ramachandran et al., 2006; Xie et al., 1997), possivelmente em função do efeito do *salting-out*, que consiste em uma menor solubilidade dos solutos neutros em água quando na presença de íons dissolvidos (Jeon et al., 2010; Turner, 2003).

Figura 1. Porcentagem de consumo (●) e depleção (■) do fenantreno ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) medidos por fluorescência na água dos aquários durante 24 h de exposição: (A) Salinidade 35; (B) Salinidade 25 e (C) Salinidade 10.



Após o período de aclimação, os níveis de PHE encontrados nos tecidos de ostra foram, respectivamente, 3,5; 3,4 e 5,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco nas salinidades 35, 25 e 10. Ao final das 96 h de exposição, os grupos controles apresentaram níveis de PHE de 3,1; 3,3 e 3,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco e as ostras dos grupos expostos apresentaram níveis de PHE de 70,0; 88,4 e 81,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco nas salinidades 35, 25 e 10, respectivamente. Após 96 h de exposição, os níveis de PHE nas ostras dos grupos expostos apresentaram-se cerca de 26 vezes maiores do que os níveis dos grupos controles, independentemente da salinidade testada ($p < 0,05$) (Figura Suplementar 2). Uma vez que bivalves são animais sésseis, filtradores e expostos constantemente a compostos químicos, o acúmulo de HPAs nesses animais tem sido observado (Liu et al., 2014; Luna-Acosta et al., 2015; Maioli et al., 2010). Estudos indicam que os bivalves possuem uma habilidade limitada de metabolizar os HPAs, o que também pode contribuir para a bioconcentração destes compostos (Hannam et al., 2010; Renault, 2015).

2.5.2. Respostas transcricionais de genes de biotransformação em brânquias de *C. brasiliana*

Os níveis de transcritos de *Citocromo P450 356A1-like* (*CYP356A1-like*) em brânquias de ostras foram afetados apenas pela salinidade e apresentaram-se 2,4 vezes mais altos nas ostras do grupo controle mantido à salinidade 10, comparado ao grupo mantido à salinidade 25, após 96 h (Figura 2A). Os níveis de transcritos do gene *CYP356A1* têm sido propostos como biomarcadores moleculares de exposição ao esgoto sanitário em *Crassostrea gigas* (Flores-Nunes et al., 2015; Medeiros et al., 2008; Rodrigues-Silva et al., 2015; Toledo-Silva et al., 2008). Porém, nesses estudos, não foi avaliada a possível interferência dos efeitos da salinidade nos níveis de transcritos do gene *CYP356A1* em *C. gigas*. No presente estudo foram observados maiores níveis de transcrição do gene *CYP356A1-like* em ostras aclimatadas a baixas salinidades e, portanto, a salinidade deve ser considerada para o uso de *C. brasiliana* como sentinela, uma vez que pode ser um importante modulador da transcrição desse gene, nessa espécie.

Em condições hiposmóticas, os bivalves marinhos podem promover a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Yin et al., 2011). Essas EROs são capazes de ativar o fator nuclear eritróide Nrf2 e Keap-1, sendo esses dois genes identificados em *C. gigas* (Giuliani e Regoli, 2014; Zhang et al., 2016). O gene *Nrf2* modula uma bateria gênica envolvida nos processos de defesa antioxidante e biotransformação de

xenobióticos, como *GSTs* e *CYPs450* de mamíferos e peixes (Giuliani e Regoli, 2014; Wu et al., 2012). O aumento da transcrição do gene *CYP356A1-like* em condições hiposmóticas pode estar associado à modulação via *Nrf2* em *C. brasiliiana*. Contudo, são necessários mais estudos que reforcem essa hipótese.

Mudanças nos níveis de transcrição gênica ao longo do tempo, em animais submetidos a estresse crônico podem ocasionar oscilações nos padrões de expressão gênica (Calduch-Giner et al., 2010; Saera-Vila et al., 2009). Peixes expostos a estresse de confinamento apresentaram induções e repressões gênicas ao longo do tempo de exposição, seguidas pelo retorno dos níveis de transcritos a valores semelhantes aos do período inicial de exposição (T0) (Calduch-Giner et al., 2010; Saera-Vila et al., 2009). Essas variações nas respostas são esperadas em experimentos que levam em consideração a submissão ao estresse ao longo do tempo e podem explicar as mudanças nos padrões de níveis de transcritos encontrados em 24 h e 96 h, em ostras *C. brasiliiana* submetidas a longos períodos de estresse osmótico.

Maiores níveis de transcritos de *Citocromo P450 2-like1 (CYP2-like1)* (Figura 2B) e *Citocromo P450 2AU1 (CYP2AU1)* (Figura 2D) foram observados em ostras expostas ao PHE por 24 h à salinidade 10, quando comparadas aos seus respectivos controles. Esses resultados enfatizam a hipótese de que, em baixas salinidades e exposições de curto prazo, as brânquias de *C. brasiliiana* possuem a capacidade de aumentar a biotransformação do PHE. Após 96 h de exposição, os níveis de transcritos de *CYP2-like1* e *CYP2AU1* retornaram aos níveis do grupo controle. Para o outro gene da família 2, *Citocromo P450 2-like2 (CYP2-like2)*, maiores níveis de transcritos foram encontrados no grupo exposto ao PHE comparado ao respectivo controle, apenas em condições hiposmóticas (Figura 2C). A família *CYP2* é a maior e mais diversa família dos genes citocromo P450 e desempenha um importante papel no metabolismo de compostos endógenos e exógenos, como drogas e químicos ambientais (por exemplo, HPAs) em ratos, camundongos, coelhos, humanos e outros organismos (Nelson et al., 1996; Kim et al., 2015). Induções em genes *CYP2-like* foram previamente reportadas em ostras (Lüchmann et al., 2014); caranguejos (Dam et al., 2006); vieiras (Piazza et al., 2016) e peixes (Yuan et al., 2013) expostos a HPAs, sugerindo o envolvimento de genes da família *CYP2* no metabolismo de PHE em *C. brasiliiana*.

Os níveis de transcritos do gene *CYP2-like1* foram afetados apenas pelo PHE, reforçando o envolvimento desse gene no metabolismo de biotransformação em brânquias de *C. brasiliiana*. Efeitos de salinidade e

PHE foram observados nos níveis de transcritos de *CYP2A1* nas brânquias das ostras, e não houve interação entre os dois fatores. Níveis mais baixos de transcritos (1,8 vezes) foram encontrados no gene *CYP2A1* em ostras mantidas em salinidade 10, comparadas às ostras mantidas em salinidade 25, após 24 h (Figura 2D). Um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório mostrou um aumento de cerca de 12 vezes nos níveis de transcritos do gene *CYP2A1* em ostras *C. brasiliana* expostas a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de PHE por 96 h (Lüchmann et al., 2014). A partir da técnica de hibridização *in situ*, Dos Reis e colaboradores (2015), encontraram maiores níveis de transcritos desse mesmo gene em brânquias, manto e intestino de *C. brasiliana* expostas a concentrações de 100 e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de PHE por 1, 2 e 10 dias. Ambos experimentos, além de mostrarem induções no gene *CYP2A1*, foram realizados com o uso de água a salinidade 25. O presente estudo, portanto, sugere que a avaliação dos níveis de transcritos do gene *CYP2A1* leve em consideração a salinidade em que os organismos serão coletados e expostos.

Foi observado efeito de interação entre os fatores salinidade e PHE nos níveis de transcritos do gene *CYP2-like2* nas brânquias das ostras expostas a PHE, em salinidade 10. Esse grupo (F10) apresentou valores maiores do que seu respectivo grupo controle (C10), do que o grupo F25 (2,4 vezes) e do que o grupo F35 (1,9 vezes) (Figura 2D).

Foi observado também um efeito de interação entre os fatores salinidade e PHE nos níveis de transcritos do gene *Sulfotransferase-like (SULT-like)*, em ostras expostas ao PHE e salinidade 10, em 24 h. Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos PHE e controle submetidos à salinidade 10 (2,8 vezes maior em F10) e também entre o grupo F10 e os grupos F25 e F35 (3,8 vezes maior e 2,7 vezes maior, respectivamente) (Figura 2E). Sugere-se que os efeitos do PHE observados nos genes *SULT-like* em ostras expostas à salinidade 10 em 24 h, assim como em *CYP2-like2*, podem envolver a via do AhR-ARNT na indução desses genes (Fu et al., 2011). Entretanto, não foram observadas diferenças na transcrição gênica de *Receptor Nuclear Translocador de Aril Hidrocarbonetos-like (ARNT-like)* (Figura Suplementar 3A). Ainda relacionado ao gene *SULT-like*, após 96 h de exposição, houve apenas o efeito da salinidade, onde maiores níveis de transcritos foram observados nas ostras expostas ao PHE em salinidade 10, quando comparadas às ostras expostas a salinidade 25 e 35 (1 vez). Essa alteração nos efeitos ao longo do tempo pode estar associada a uma adaptação celular ao PHE após a exposição contínua ao contaminante. Os efeitos da salinidade observados nos genes *SULT-like* e *CYP2-like2* pode

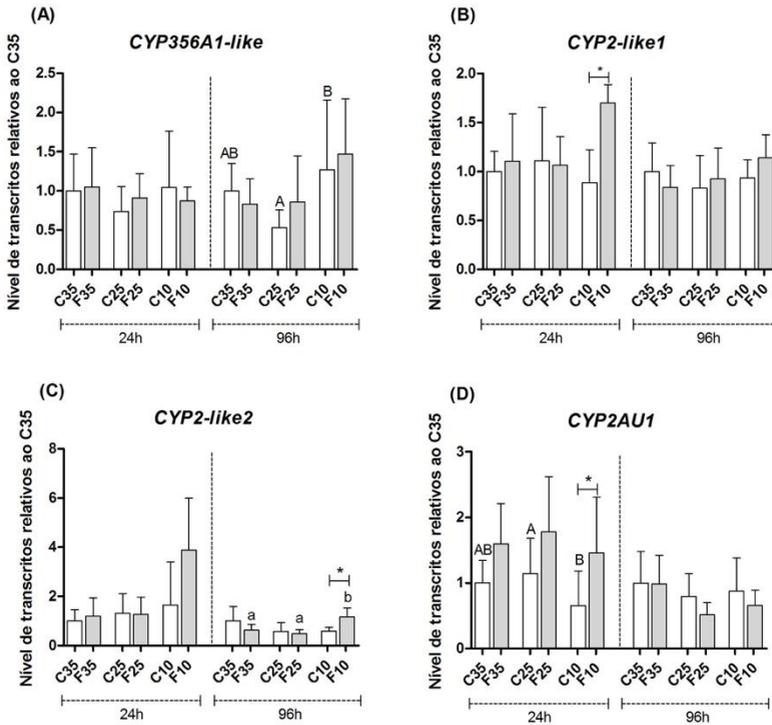
estar associado à geração de EROs em condições hiposmóticas (Yin et al., 2011). Rapidamente, o aumento do metabolismo mitocondrial causado pela condição hiposmótica pode aumentar a produção de EROs. Além disso, o processo de biotransformação do PHE pode produzir metabólitos intermediários, como as fenantrenoquinonas (PHQ), que por sua vez, podem sofrer ciclo redox e gerar EROs (Hassspieler e DiGiulio, 1994; Wang et al., 2009; Xie et al., 2006). A interação entre a aclimação salina e a exposição ao PHE nos níveis de transcritos desses dois genes enfatiza a influência da salinidade em *C. brasiliiana* exposta ao PHE. Essa influência pode acarretar implicações nas respostas bioquímicas adaptativas, em curto prazo, nestes organismos expostos a PHE em condições de campo, por exemplo. Sugere-se que as respostas moleculares coordenadas possam constituir um mecanismo celular homeostático para a detoxificação do PHE nessa espécie.

Apenas efeito da salinidade foi observado nos níveis de transcritos das isoformas de *Glutathione-S-transferase* *ômega-like* (*GST Ω -like*) e *Glutathione-S-transferase* *microsomal-like* (*GSTm-like*), dois genes de biotransformação de fase II. Níveis mais altos de transcritos de *GST Ω -like* foram observados nas ostras do grupo controle em salinidade 10 comparadas com as mantidas em salinidade 35 (2 vezes), após 24 h de exposição. Ainda referente a esse gene, ostras expostas ao PHE em salinidade 10 apresentaram maiores níveis de transcritos do que aquelas mantidas à salinidade 25 (2,5 vezes) e 35 (2,8 vezes) (Figura 2F). Somente após 96 h de exposição foram observados níveis semelhantes de transcritos do gene *GSTm-like* 2 vezes maiores nas ostras do grupo controle em salinidade 10 com os grupos controle mantidos às salinidades 25 e 35 (Figura 2G). Estudos recentes relataram diferenças na transcrição dos genes *GST Ω* e *GSTm* em bivalves expostos a hidrocarbonetos, o que faz com que essas isoformas sejam consideradas potenciais biomarcadoras de exposição a estes compostos (Boutet et al., 2004; Lüchmann et al., 2014; Won et al., 2013; Zhang et al., 2012). Corroborando esses resultados, Lüchmann e colaboradores (2014) verificaram uma indução desses mesmos dois genes em brânquias de *C. brasiliiana* expostas a níveis elevados de PHE (1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), todavia, nenhuma diferença foi encontrada pelos mesmos autores nas ostras expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PHE.

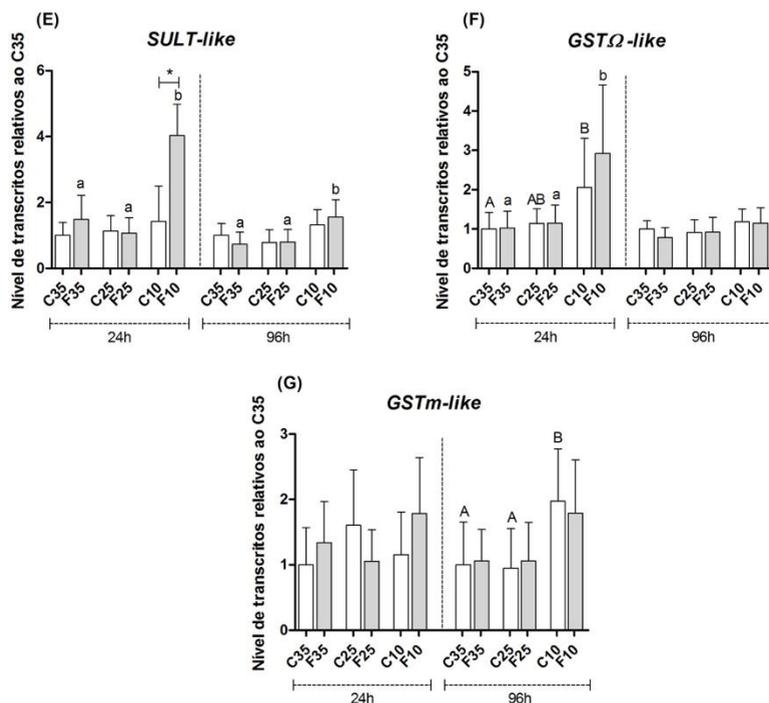
O gene *GSTm-like* foi classificado como pertencente à família de proteínas associadas de membrana envolvidas no metabolismo de eicosanóides e glutathione (MAPEG, do inglês *Membrane-Associated Protein Eicosanoid and Glutathione*), e faz parte do sistema de biotransformação do ácido araquidônico (Hayes et al., 2005; Jakobsson

et al., 2000; Lüchmann et al., 2015). As GSTs microssomais podem ainda estar envolvidas na detoxificação de xenobióticos orgânicos e a expressão desses genes pode ser regulada em situações de estresse oxidativo celular (Hayes et al., 2005; Higgins e Hayes, 2011; Kelner et al., 2000). Há evidências de que o gene *GSTΩ* pode estar envolvido na proteção contra estresse oxidativo e modulação de canais de íon Ca^{2+} (Dulhunty et al., 2001; Hayes et al., 2005), uma vez que situações de estresse oxidativo podem causar o incremento de Ca^{2+} para o citoplasma (Dulhunty et al., 2000). Em condições hipo salinas, o gradiente osmótico através da membrana celular pode levar a mudanças no volume celular, aumentando o incremento de Ca^{+2} extracelular (Seale et al., 2012). Meng e colaboradores (2013) observaram um aumento na transcrição de canais de Ca^{2+} em *C. gigas* submetidas a condições hiposmóticas, e atribuíram esse aumento à necessidade de manutenção do balanço iônico entre os fluidos intracelulares e extracelulares. Finalmente, os resultados encontrados para os níveis mais altos de transcritos de *GSTΩ-like* em salinidade 10, podem estar associados à modulação dos íons Ca^{2+} em brânquias de *C. brasiliiana*, entretanto, é necessária a realização de outros estudos que confirmem essa hipótese.

Figura 2. Níveis de transcritos dos genes: (A) *CYP356A1-like*; (B) *CYP2-like1*; (C) *CYP2-like2* e (D) *CYP2AU1*; (E) *SULT-like*; (F) *GSTΩ-like* e (G) *GSTM-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno 100 µg.L⁻¹ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade 35 ± desvio padrão ($p < 0,05$), para $n = 10$.



Continuação...

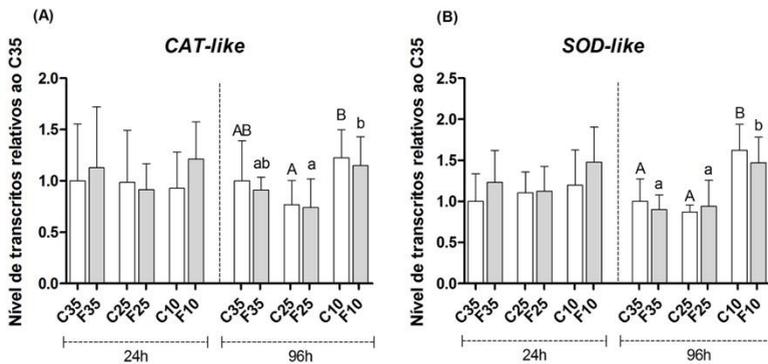


2.5.3. Respostas transcricionais de genes relacionados ao estresse oxidativo em brânquias de *C. brasiliana*

Mudanças na salinidade, temperatura, níveis de oxigênio e nas concentrações de contaminantes na água podem causar estresse e levar os animais aquáticos à morte (Lushchak, 2011; Valavanidis et al., 2006). Sob essas condições, os organismos podem estar sujeitos ao estresse oxidativo quando a maquinaria das defesas antioxidantes celulares é sobreposta pela excessiva produção de EROs (Ray et al., 2012). No presente estudo, os níveis de transcritos do gene da *Catalase-like* (*CAT-like*) foram mais altos nas ostras do grupo controle com salinidade 10, comparados com a salinidade 25 (1,6 vezes) após 96 h (Figura 3A). Os transcritos do gene *Superóxido dismutase-like* (*SOD-like*) das ostras dos grupos controle e exposto ao PHE, em salinidade 10 foram cerca de 2 vezes mais altos comparados aos grupos em salinidades 25 e 35 (Figura 3B). Somente o

efeito da salinidade foi observado nos genes *CAT-like* e *SOD-like* ($p < 0,05$), após 96 h de exposição.

Figura 3. Níveis de transcritos dos genes: (A) *CAT-like* e (B) *SOD-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade 35 \pm desvio padrão ($p < 0,05$), para $n = 10$.



Estudos anteriores demonstraram que organismos aquáticos podem aumentar suas maquinarias antioxidantes em níveis enzimáticos e transcricionais sob condições hiposmóticas (Carregosa et al., 2014; Paital e Chainy, 2010; Zhao et al., 2015). Portanto, sugere-se que, em baixas salinidades, a produção de EROs é estimulada nesses organismos, levando ao aumento dos níveis de transcritos que codificam para enzimas antioxidante, como *CAT-like* e *SOD-like*. Essas respostas corroboram a hipótese de que, em ambientes hiposmóticos, os organismos expostos ao PHE podem estar submetidos a uma condição pró-oxidante que provoca um aumento nas respostas transcricionais de genes relacionados a defesa antioxidante e mecanismos de biotransformação. Os níveis de transcritos do gene *Glutathione peroxidase-like* (*GPx-like*) em brânquias de *C. brasiliana* não variaram entre os grupos (Figura Suplementar 3B).

2.5.4. Respostas transcricionais de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e lipídios em brânquias de *C. brasiliiana*

Quando submetidos às variações salinas, os animais osmoconformadores necessitam ajustar os solutos intracelulares para adaptar-se ao ambiente externo. Para ajustar a pressão osmótica intracelular causada pelas variações de salinidade, as células dos moluscos bivalves utilizam além de íons inorgânicos, também aminoácidos altamente solúveis (Bishop et al., 1994). Dentre os aminoácidos mais importantes para a osmorregulação da ostra do Pacífico *C. gigas*, estão a glicina, prolina, alanina, beta-alanina, arginina e taurina (Hosoi et al., 2003). Em condições ambientais hiposmóticas, a concentração de aminoácidos intracelulares tende a diminuir. Já em condições hiperosmóticas, os níveis de aminoácidos livres dentro das células, tendem a aumentar (Meng et al., 2013). Com a finalidade de regular essas concentrações, os bivalves possuem a capacidade de assimilar diretamente os aminoácidos da água através das brânquias, consideradas o principal tecido osmorregulador nesses animais (Rice et al., 1980; Stephen e Schinske, 1961; Wendt e Johnson, 2006; Wright, 1988). Para a assimilação dos íons e aminoácidos da água às células branquiais em condições hiposmóticas, diversos transportadores são induzidos. Uma vez que a osmoregulação é finalizada, esses transportadores podem ser novamente regulados para suprimir o transporte ativo dos solutos ao citosol (Lockwood e Somero, 2011).

Os níveis de transcritos de quatro genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos foram analisados nesse estudo: *Transportador de Glicina-like (GLYT-like)*, *Transportador de Taurina-like (TAUT-like)*, *Arginase-like (ARG-like)* e *Glutamato descarboxilase-like (GAD-like)*. Os transcritos do gene *GLYT-like* foram afetados pela salinidade e apresentaram maiores níveis nas ostras mantidas à salinidade 35 (controle), comparada com a salinidade 10 (1,7 vezes) após 96 h de exposição (Figura 4A). Os transcritos do gene *TAUT-like* também foram afetados pela salinidade (24 h e 96 h) e mostraram maiores níveis nas ostras controle mantidas em salinidade 35, comparadas com as mantidas às salinidades 25 e 10 (1,7 vezes) (Figura 4B). Ainda com relação ao gene *TAUT-like*, as ostras expostas ao PHE em salinidade 35 apresentaram maiores níveis de transcritos (2 vezes) comparadas aos grupos F25 e F10 (24 h e 96 h). Os menores níveis de transcritos de *GLYT-like* e *TAUT-like* em ostras *C. brasiliiana* mantidas a condições hiposmóticas podem estar relacionados à menor necessidade de assimilação de aminoácidos. Corroborando esses resultados, estudos realizados com *C. gigas*, *Macoma*

balthica e *Mytilus spp.* (Hosoi et al., 2003; Kube et al., 2007; Pierce et al., 1992) relataram aumentos das concentrações intracelulares de glicina nos animais expostos a altas salinidades, e diminuição das concentrações intracelulares de glicina em baixas salinidades. Lockwood e Somero (2011) encontraram menores níveis de transcritos do gene *GLYT* em mexilhões expostos a estresse hiposmótico. Resultados similares foram encontrados por Hosoi e colaboradores (2007) para a transcrição do gene *TAUT* em *C. gigas* expostas a estresse salino. Hosoi e colaboradores (2005) concluíram que os maiores níveis de transcritos do gene *TAUT* foram correlacionados com um aumento na concentração intracelular de taurina, sugerindo uma boa adaptabilidade de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* em condições hiposmóticas.

Os moluscos bivalves possuem outros mecanismos para ajustar os osmólitos intracelulares. Em condições hiposmóticas, alguns tecidos como, por exemplo, o coração, são capazes de liberar aminoácidos livres para a hemolinfa, com a finalidade de diminuir a osmolaridade intracelular (Meng et al., 2013). A arginina é um importante aminoácido usado para a osmoregulação em bivalves (Hosoi et al., 2003), e pode ser degradada pela enzima arginase (ARG), gerando ornitina e uréia (Morris, 2002). As ostras *C. brasiliana* mantidas em salinidade 10 por 96 h apresentaram níveis de transcritos mais altos (1,5 vezes) do gene *ARG-like*, quando comparadas às mantidas em salinidades 25 e 35 (Figura 4C). Os níveis de transcritos mais elevados de *ARG-like* observados nas ostras em salinidade 10 podem estar contribuindo para a manutenção da homeostase da arginina e osmoregulação, uma vez que a atividade da ARG gera uréia, que pode ser subsequentemente excretada, diminuindo a pressão osmótica nas brânquias das ostras em condições hiposalinas (Rodrigues et al., 2009).

A enzima Glutamato descarboxilase (GAD) catalisa a descarboxilação do ácido aspártico para gerar beta-alanina e CO₂ (Meng et al., 2013). Níveis de transcritos mais altos de *GAD-like* foram observados em *C. brasiliana* expostas ao PHE e mantidas em salinidade 35 e 25, comparadas com as ostras mantidas em salinidade 10 (1,7 vezes), após 24 h de exposição (Figura 4D). Sugere-se que esses resultados estejam relacionados com um aumento da necessidade de beta-alanina para a osmorregulação celular. Entretanto, mais estudos são necessários. Um resumo dos resultados encontrados pode ser observado na Figura 5.

Figura 4. Níveis de transcritos dos genes: (A) *GLYT-like*; (B) *TAUT-like*; (C) *ARG-like* e (D) *GAD-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade 35 \pm desvio padrão ($p < 0,05$), para $n = 10$.

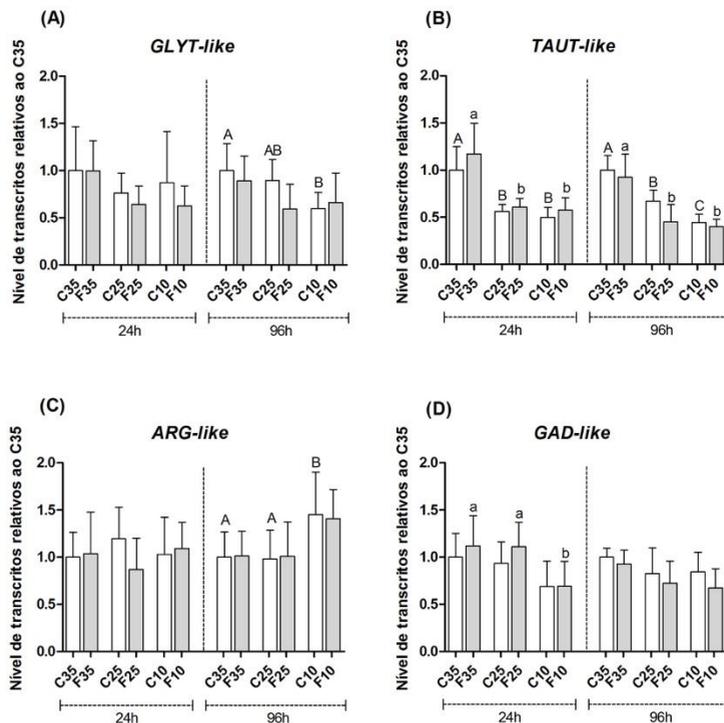
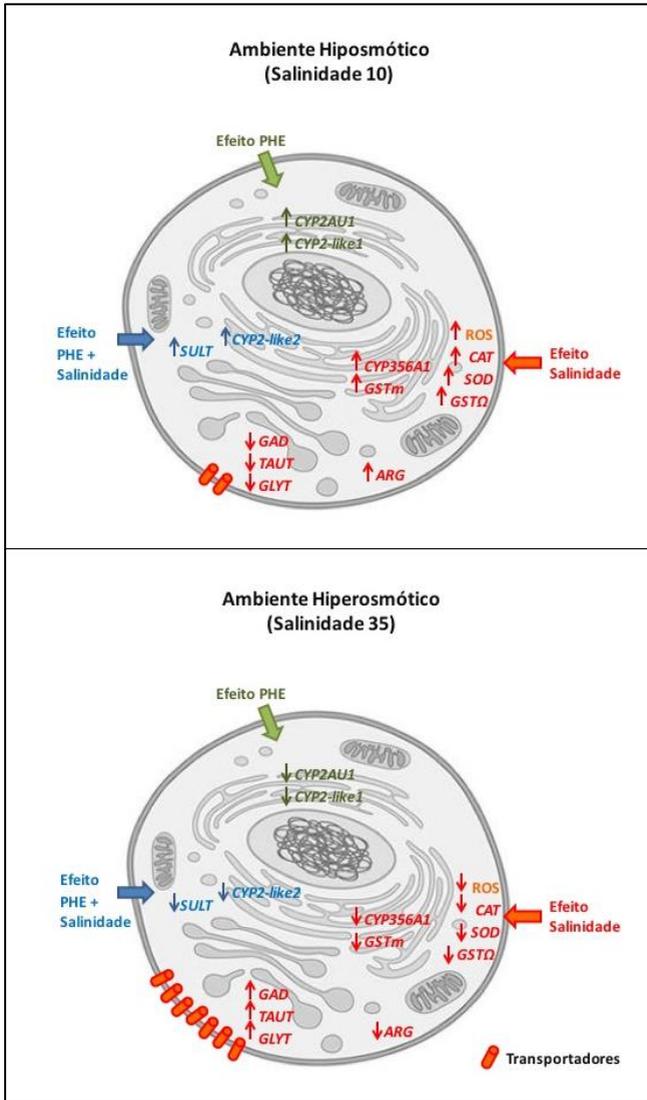


Figura 5. Desenho esquemático representando as variações dos níveis de transcritos em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas ao fenantreno em duas salinidades: 10 e 35.



Fonte: ZACCHI et al., 2017 (Adaptada).

As proteínas ligantes de ácidos graxos (FABPs) são proteínas citosólicas que desempenham um papel funcional no transporte intracelular e no metabolismo de lipídios, realizando a ligação e transporte de diversos compostos hidrofóbicos como, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, colesterol, moléculas endógenas como grupamentos heme, ácidos biliares e eicosanóides, drogas exógenas e xenobióticos (Esteves e Ehrlich, 2006). Níveis de expressão diferencial do gene de *Proteína Ligante de Ácidos Graxos-like (FABP-like)* foram encontrados em peixes expostos aos HPAs pireno (Bain, 2002) e antraceno (Peterson e Bain, 2004), porém, neste estudo não foram encontradas diferenças nos níveis de transcritos de *FABP-like* em *C. brasiliiana* (Figura Suplementar 3C).

2.6. Conclusão

Os genes de biotransformação de fase I e II analisados em brânquias de ostras *C. brasiliiana* foram afetados principalmente pela exposição ao PHE e salinidade, respectivamente. Além disso, os resultados de interação entre os fatores salinidade e PHE nos genes *CYP2-like2* e *SULT-like* sugerem que, em baixas salinidades, as ostras são mais susceptíveis aos efeitos do PHE em níveis transcricionais.

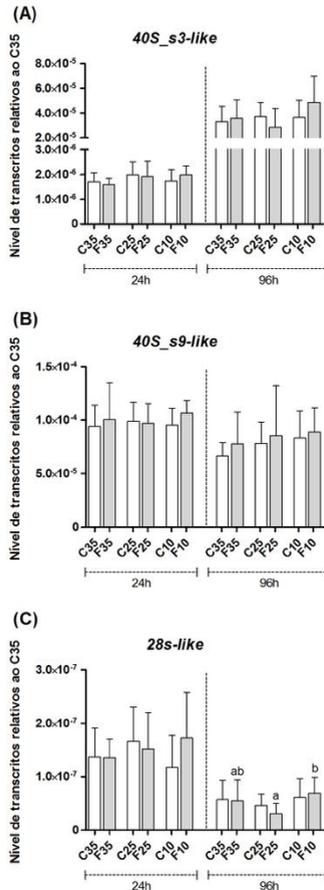
O efeito da salinidade sobre os genes relacionados ao estresse oxidativo e metabolismo de aminoácidos sugere um importante papel desses genes na codificação de proteínas que envolvem proteção contra danos oxidativos e adaptações celulares à salinidade.

A salinidade, bem como os efeitos de interação entre salinidade e PHE devem ser considerados para o uso destes e outros genes como potenciais biomarcadores de exposição ao PHE.

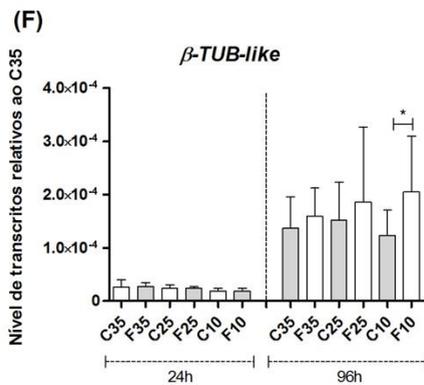
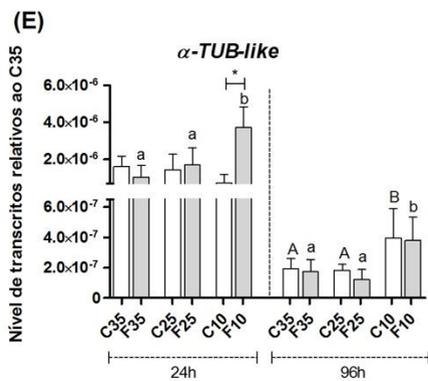
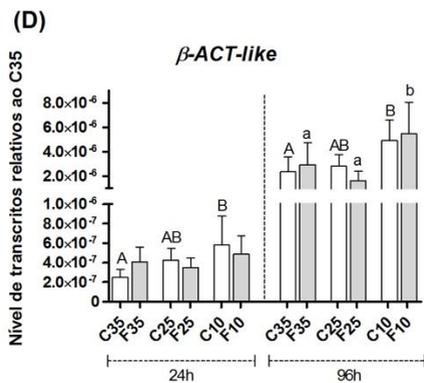
É necessária a realização de novos estudos que considerem outros fatores abióticos, como a temperatura e o pH, juntamente com o PHE, com a finalidade de compreender como esses fatores podem vir a interferir nas respostas moleculares de ostras *C. brasiliiana*.

2.7. Material suplementar

Figura Suplementar 1. Níveis de transcritos dos genes normalizadores usados: (A) *40S_s3-like* e (B) *40S_s9-like* e dos genes normalizadores testados: (C) *28s-like*; (D) *β ACT-like*; (E) *α TUB-like*; (F) *β TUB-like*; (G) *ANK-like*; (H) *EF-1 α -like* e (I) *GAPDH-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade 35 \pm desvio padrão ($p < 0,05$), para $n = 10$.



Continuação...



Continuação...

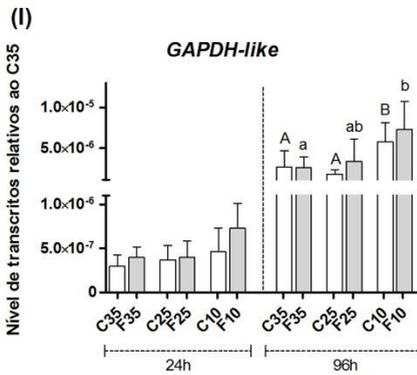
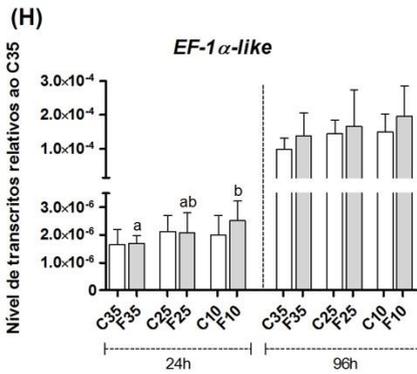
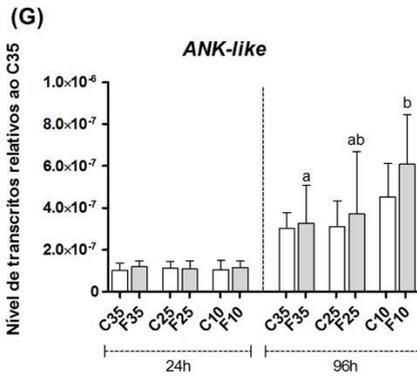


Figura Suplementar 2. Concentração de fenantreno ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno (F) em tempo zero horas (Pré exposição) e após 96 h (Pós exposição).

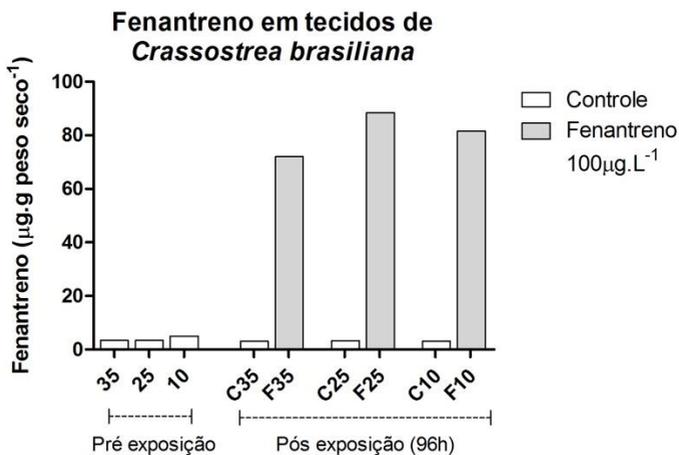
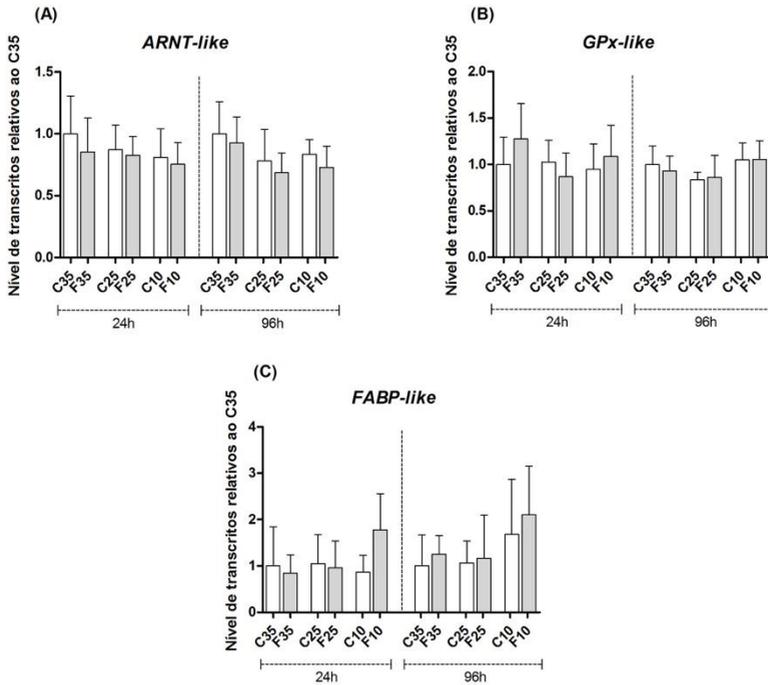


Figura Suplementar 3. Níveis de transcritos dos genes: (A) *ARNT-like*; (B) *GPx-like* e (C) *FABP-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a três salinidades (35, 25 e 10): controle (C) e fenantreno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F) em 24 h e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam as médias entre os controles. Letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos. Asteriscos (*) comparam controle *versus* fenantreno em cada salinidade. Os valores estão representados como médias relativas ao grupo controle em salinidade 35 \pm desvio padrão ($p < 0,05$), para $n = 10$.



2.8. Referências bibliográficas

- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Mascio, P.D., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 318, 21–30. doi:10.1016/j.jembe.2004.12.007
- Amaral, V.S.D., Simone, L.R.L., 2014. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia : Ostreidae) of Brazil. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 94, 1–26. doi:10.1017/S0025315414000058
- An, M.I., Choi, C.Y., 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 155, 34–42. doi:10.1016/j.cbpb.2009.09.008
- Berger, V.J., Kharazova, A.D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia* 355, 115–126. doi:10.1023/A:1003023322263
- Bain, L.J., 2002. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Mar. Environ. Res.* 54, 379–383. doi:10.1016/S0141-1136(02)00130-7
- Berger, V.J., Kharazova, A.D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia* 355, 115–126. doi:10.1023/A:1003023322263
- Bishop, S.H., Greenwalt, D.E., Kapper, M.A., Paynter, K.T., Ellis, L.L., 1994. Metabolic regulation of proline, glycine, and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. *J. Exp. Zool.* 268, 151–161. doi:10.1002/jez.1402680213
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under

experimental conditions. *Gene* 329, 147–157.
doi:10.1016/j.gene.2003.12.027

- Bruyn, W.J., Clark, C.D., Ottelle, K., Aiona, P., 2012. Photochemical degradation of phenanthrene as a function of natural water variables modeling freshwater to marine environments. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 532–538. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.12.024
- Calduch-Giner, J.A., Davey, G., Saera-Vila, A., Houeix, B., Talbot, A., Prunet, P., Cairns, M.T., Pérez-Sánchez, J., 2010. Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *BMC Genomics*. 11, 1-18. doi: 10.1186/1471-2164-11-193
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2014. Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 177-178, 1–9.
doi:10.1016/j.cbpb.2014.08.001
- Dailianis, S., Tsarpali, V., Melas, K., Karapanagioti, H.K., Manariotis, I.D., 2014. Aqueous phenanthrene toxicity after high-frequency ultrasound degradation. *Aquat. Toxicol.* 147, 32–40.
doi:10.1016/j.aquatox.2013.12.006
- Dam, E., Styrrishave, B., Rewitz, K.F., Andersen, O., 2006. Intermoult duration affects the susceptibility of shore crabs *Carcinus maenas* (L.) to pyrene and their ability to metabolise it. *Aquat. Toxicol.* 80, 290–297. doi:10.1016/j.aquatox.2006.09.006
- Deaton, L.E., 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: Rapid accumulation of betaine and alanine. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 260, 185–197.
doi:10.1016/S0022-0981(01)00237-4
- Delgado, J., Nieto, J.M., Boski, T., 2010. Analysis of the spatial variation of heavy metals in the Guadiana Estuary sediments (SW

- Iberian Peninsula) based on GIS-mapping techniques. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 88, 71–83. doi:10.1016/j.ecss.2010.03.011
- Dos Reis, I.M.M., Mattos, J.J., Garcez, R.C., Zacchi, F.L., Miguelão, T., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M., Cargnin-Ferreira, E., Bainy, A.C.D., 2015. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (*CYP2A1*) in *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 169, 79-89. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.10.011
- Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P., 2001. The Glutathione Transferase Structural Family Includes a Nuclear Chloride Channel and a Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Modulator. *J. Biol. Chem.* 276, 3319–3323. doi:10.1074/jbc.M007874200
- Dulhunty, A., Haarmann, C., Green, D., Hart, J., Al, D.E.T., 2000. Forum Minireview: How Many Cysteine Residues Regulate Ryanodine Receptor Channel Activity? *Antioxid. Redox Sign.* 2, 27-34. doi:10.1089/ars.2000.2.1-27
- Eganhouse, R.P., Calder, J.A., 1976. The solubility of medium molecular weight aromatic hydrocarbons and the effects of hydrocarbon co-solutes and salinity. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40, 555–561. doi:10.1016/0016-7037(76)90223-4
- Elliott, M., McLusky, D.S., 2002. The need for definitions in understanding estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55, 815–827. doi:10.1006/ecss.2002.1031
- Esteves, A., Ehrlich, R., 2006. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 142, 262–274. doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.006
- Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Serrano, M.A., Piazza, C.E., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Melo, C.M., Bainy, A.C.D., 2015. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster

Crassostrea gigas. Environ. Sci. Pollut. Res. 1-11.
doi:10.1007/s11356-015-4486-7

Fu, J., Fang, H., Paulsen, M., Ljungman, M., Kocarek, T.A., Runge-Morris, M., 2011. Regulation of estrogen sulfotransferase expression by confluence of MCF10A breast epithelial cells: role of the aryl hydrocarbon receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 339, 597–606. doi:10.1124/jpet.111.185173

Giuliani, M.E., Regoli, F., 2014. Identification of the Nrf2–Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: Role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 150, 117-123. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.003

Guo, H., Zhang, D., Cui, S., Chen, M., Wu, K., Li, Y., Su, T., Jiang, S., 2011. Molecular characterization and mRNA expression of catalase from pearl oyster *Pinctada fucata*. Mar. Genomics 4, 245–251. doi:10.1016/j.margen.2011.05.003

Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Nova York.

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., Jones, M.B., 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. Chemosphere 78, 779–784. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.049

Hasspieler, B.M., DiGiulio, R.T., 1994. Dicoumarol-Sensitive NADPH: Phenanthrenequinone Oxidoreductase in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). 125, 184-191. doi:10.1006/taap.1994.1063

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857

Higgins, L.G., Hayes, J.D., 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by

- xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* 43, 92–137. doi:10.3109/03602532.2011.567391
- Hosoi, M., Kubota, S., Toyohara, M., Toyohara, H., 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fisheries Sci.* 69, 395-400. doi:10.1046/j.1444-2906.2003.00634.x
- Hosoi, M., Shinzato, C., Takagi, M., Hosoi-Tanabe, S., Sawada, H., Terasawa, E., Toyohara, H., 2007. Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expression in response to hyper- and hypo-osmotic stress. *Fisheries Sci.* 73, 385–394. doi:10.1111/j.1444-2906.2007.01346.x
- Hosoi, M., Takeuchi, K., Sawada, H., Toyohara, H., 2005. Expression and functional analysis of mussel taurine transporter, as a key molecule in cellular osmoconforming. *J. Exp. Biol.* 208, 4203–4211. doi:10.1242/jeb.01868
- Hu, F., Pan, L., Xiu, M., Jin, Q., Wang, G., Wang, C., 2015. Bioaccumulation and detoxification responses in the scallop *Chlamys farreri* exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 997–1007. doi:10.1016/j.etap.2015.03.006
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 2000. Membrane-associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am. J. Crit. Care Med.* 161, 520-524. doi:10.1164/ajrccm.161.supplement_1.ltta-5
- Jeon, J. et al., 2010. Bioaccumulation of perfluorochemicals in Pacific oyster under different salinity gradients. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2695–2701. doi:10.1021/es100151r
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 147, 460–469. doi:10.1016/j.cbpc.2008.02.001

- Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Takase, M., Hanada, H., Nakamura, M., 1997. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 118, 499–503.
doi:10.1016/S0305-0491(97)00216-2
- Kelner, M.J., Bagnell, R.D., Montoya, M.A., Estes, L.A., Forsberg, L., Morgenstern, R., 2000. Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (MGST1) on chromosome 12p13.1-13.2. Identification of the correct promoter region and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 275, 13000–13006.
doi:10.1074/jbc.275.17.13000
- Kennish, M.J., 1992. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. Londres: CRC Press, p. 494.
- Kim, B.-M., Rhee, J.S., Hwang, U.K., Seo, J.S., Shin, K.H., Lee, J.S., 2015. Dose- and time-dependent expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in PCB-, B[a]P-, and TBT-exposed intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere* 120, 398–406.
doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.099
- Kube, S., Sokolowski, A., Jansen, J.M., Schiedek, D., 2007. Seasonal variability of free amino acids in two marine bivalves, *Macoma balthica* and *Mytilus spp.*, in relation to environmental and physiological factors. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147, 1015–1027. doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.012
- Lazoski, C., Gusmão, J., Boudry, P., Solé-Cava, A.M., 2011. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: Evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 426, 197–212. doi:10.3354/meps09035
- Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y., Miao, J., 2014. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 251–259. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.024

- Lockwood, B.L., Somero, G.N., 2011. Transcriptomic responses to salinity stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*). *Mol. Ecol.* 20, 517–529. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04973.x
- Lüchmann, K.H., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Daura-Jorge, F.G., Bairy, A.C.D., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquat. Toxicol.* 105, 652–660. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.003
- Lüchmann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan, R., Craft, J.A., Meng, X., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C., Bairy, A.C.D., 2014. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 152, 324–334. doi:10.1016/j.aquatox.2014.04.021
- Lüchmann, K.H., Clark, M.S., Bairy, A.C.D., Gilbert, J.A., Craft, J.A., Chipman, J.K., Thorne, M.A., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Schroeder, D.C., 2015. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. *Aquat. Toxicol.* 166, 10–20. doi:10.1016/j.aquatox.2015.06.012
- Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Budzinski, H., Huet, V., Thomas-Guyon, H., 2015. Persistent organic pollutants in a marine bivalve on the Marennes–Oléron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic Coast)—Part 2: Potential biological effects. *Sci. Total Environ.* 514, 511–522. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.050
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Machado, A.A., Hoff, M.L., Klein, R.D., Cordeiro, G.J., Lencina Avila, J.M., Costa, P.G., Bianchini, A., 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Mar. Environ. Res.* 98, 96–105. doi:10.1016/j.marenvres.2014.03.013

- MacLeod, W.D., Brown, D.W., Fiedman, A.J., Burrows, D.G., Maynes, O., Pearce, R.W., Wilgren, C.A., Bogar, R.G. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, 121.
- Maioli, O.L.G., Rodrigues, K.C., Knoppers, B.A., Azevedo, D.A., 2010. Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Mundaú Lagoon, Brazil. *Microchem. J.* 96, 172–179. doi:10.1016/j.microc.2010.03.001
- Matsushima, O., Katayama, H., Yamada, K., 1987. The capacity for intracellular osmoregulation mediated by free amino acids in three bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 109, 93–99. doi:10.1016/0022-0981(87)90187-0
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodrigues, T.B., Marques, M.R., Bainy, A.C.D., 2008. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 362–365. doi:10.1016/j.etap.2008.05.004
- Meng, J., Zhu, Q., Zhang, L., Li, C., Li, L., She, Z., Huang, B., Zhang, G., 2013. Genome and Transcriptome Analyses Provide Insight into the Euryhaline Adaptation Mechanism of *Crassostrea gigas*. *PLoS One.* 8, 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0058563
- Morris, S.M., 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 87–105. doi:10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonsalus, I.C., Nebert, D.W., 1996. Pharmacogenetics. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. 6, 1-42. doi: 10.1089/dna.1993.12.1

- Ning, D., Wang, H., Ding, C., Lu, H., 2010. Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. *Biodegradation* 21, 889–901. doi:10.1007/s10532-010-9349-9
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 151, 142–151. doi:10.1016/j.cbpc.2009.09.007
- Pessatti, T.B., Lüchmann, K.H., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bícigo, M.C., Bainy, A.C.D., 2016. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 172-180. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.003
- Peterson, J.S.K., Bain, L.J., 2004. Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 66, 345–355. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.005
- Piazza, R.S., Trevisan, R., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Wendt, N., Mattos, J.J., Lima, D., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Mello, A.C.P., Zacchi, F.L., Serrano, M.A.S., Gomes, C.H.A.M., Bícigo, M.C., Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., 2016. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. *Aquat. Toxicol.* 177, 146-155. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.05.025
- Pie, M.R., Ribeiro, R.O., Boeger, W.A., Ostrensky, A., Falleiros, R.M., Angelo, L., 2006. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. *Aquac. Res.* 37, 1598–1600. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01591.x

- Pierce, S.K., Brien, S.M.O., Brunswick, N., 1992. Marine Biology and Chesapeake Bay conspecific oysters : glycine betaine 115, 107–115. doi:10.2307/1541452
- Powell, E.N., Kasschau, M., Chen, E., Koenig, M., Pecon, J., 1982. Changes in the free amino acid pool during environmental stress in the gill tissue of the oyster, *Crassostrea virginica*. Comp. Biochem. Physiol. 71A, 591–598. doi:10.1016/0300-9629(82)90208-0
- Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. Mar. Pollut. Bull. 52, 1182–1189. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.02.009
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell. Signal. 24, 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- Renault, T., 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. Fish Shellfish Immunol. 46, 88–93. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.011
- Rice, M.A., Wallis, K., Stephens, G.C., 1980. Influx and net flux of amino acids into larval and juvenile European flat oysters, *Ostrea edulis* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 48, 51-59. doi:10.1016/0022-0981(80)90006-4
- Rodrigues, E., Santos, M.R.D.S., Rodrigues Júnior, E., Gannabathula, S.V., Lavrado, H.P., 2009. Arginine metabolism of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip, 1831): An ecophysiological approach. Polar Biol. 32, 691–702. doi:10.1007/s00300-008-0574-1
- Rodrigues-Silva, C., Flores-Nunes, F., Vernal, J.I., Cargnin-Ferreira, E., Bainy, A.C.D., 2015. Expression and immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isoform 356A1 (CYP356A1)

in oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 159, 267–275.
doi:10.1016/j.aquatox.2014.12.021

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Prunet, P., Pérez-Sánchez, J., 2009. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement differential stress response of growth hormone receptors. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 154, 197-203. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.06.004

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
doi:10.1038/nprot.2008.73

Seale, A.P., Watanabe, S., Grau, E.G., 2012. Osmoreception: Perspectives on signal transduction and environmental modulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 354–360.
doi:10.1016/j.ygcen.2011.10.005

Serrano, M.A.S., Gonzalez-Rey, M., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Mello, A.C.P., Zacchi, F.L., Piazza, C.E., Siebert, M.N., Piazza, R.S., Alvarez-Muñoz, D., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Bebianno, M.J., Gomes, C.H.A.M., Melo, C.M.R., Bairy, A.C.D., 2015. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-11.
doi:10.1007/s11356-014-4023-0

Shukla, P., Gopalani, M., Ramteke, D.S., Wate, S.R., 2007. Influence of salinity on PAH uptake from water soluble fraction of crude oil in *Tilapia mossambica*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 601–605. doi:10.1007/s00128-007-9272-x

Shumway, S.E., Gabbott, P.A., Youngson, A., 1977. The effect of fluctuating salinity on the concentrations of free amino acids and ninhydrin-positive substances in the adductor muscles of eight species of bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 29, 131–150.
doi:10.1016/0022-0981(77)90044-2

- Stephens, G.C., Schinske, R.A., 1961. Uptake of amino acids by marine invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 6, 175-181.
doi:10.4319/lo.1961.6.2.0175
- Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T.C., Moraes, M.O., Goldstone, J.V., Bainy, A.C.D., 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 66, 15–18.
doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.010
- Turner, A., 2003. Salting out of chemicals in estuaries: Implications for contaminant partitioning and modelling. *Sci. Total Environ.* 314-316, 599–612. doi:10.1016/S0048-9697(03)00076-7
- Unger, M.A., Newman, M.C., Vadas, G.G., 2007. Predicting survival of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to naphthalene, fluorene, and dibenzothiophene. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1802–1808. doi:10.1897/07-463.1
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullas, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
- Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., Silva, M.D., Randi, M.A., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environ. Res.* 105, 350–363.
doi:10.1016/j.envres.2007.06.003
- Wang, S., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S.E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y., Guo, X., Liu, Z., 2010. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 921–929. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.035

- Wang, W., Nykamp, J., Huang, X.D., Gerhardt, K., Dixon, D.G., Greenberg, M.B., 2009. Examination of the mechanism of phenanthrenequinone toxicity to *Vibrio fischeri*: evidence for a reactive oxygen species-mediated toxicity mechanism. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1655–1662. doi:10.1897/08-463.1
- Wendt, D.E., Johnson, C.H., 2006. Using latent effects to determine the ecological importance of dissolved organic matter to marine invertebrates. *Integr. Comp. Biol.* 46, 634–642. doi:10.1093/icb/icl025
- Won, E.J., Rhee, J.S., Shin, K.H., Jung, J.H., Shim, W.J., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2013. Expression of three novel cytochrome P450 (CYP) and antioxidative genes from the polychaete, *Perinereis nuntia* exposed to water accommodated fraction (WAF) of Iranian crude oil and Benzo[α]pyrene. *Mar. Environ. Res.* 90, 75–84. doi:10.1016/j.marenvres.2013.05.014
- Wright, S.H., 1988. Amino acid transport in the gills epithelium of a marine bivalve. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A, 635–641. doi:10.1016/0300-9629(88)90678-0
- Wu, K.C., Cui, J.Y., Klaassen, C.D., 2012. Effect of graded Nrf2 activation on phase-I and -II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. *PLoS One.* 7, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0039006
- Xie, F., Koziar, S.A., Lampi, M.A., Dixon, D.G., Norwood, P., Borgmann, U., Huang, X.D., Greenberg, B.M., 2006. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 613–622. doi:10.1897/05-256r.1
- Xie, W.H., Shiu, W.Y., Mackay, D., 1997. A review of the effect of salts on the solubility of organic compounds in seawater. *Mar. Environ. Res.* 44, 429–444. doi:10.1016/S0141-1136(97)00017-2

- Yin, F., Peng, S., Sun, P., Shi, Z., 2011. Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*. *Acta Ecol. Sin.* 31, 55–60. doi:10.1016/j.chnaes.2010.11.009
- Yuan, L., Lv, B., Zha, J., Wang, Z., Wang, W., Li, W., Zhu, L., 2013. New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo[a]pyrene. *Chemosphere* 93, 209–216. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.064
- Zanette, J., Almeida, E.A., da Silva, A.Z., Guzinski, J., Ferreira, J.F., Di Mascio, P., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2011. Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Sci. Total Environ.* 409, 1976–983. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.048
- Zhang, G., Li, L., Meng, J., Qi, H., Qu, T., Xu, F., Zhang, L., 2016. Molecular basis for adaptation of oysters to stressful marine intertidal environments. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 2.1-2.25. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110903
- Zhang, H., Pan, L., Tao, Y., 2014. Toxicity assessment of environmental pollutant phenanthrene in clam *Venerupis philippinarum* using oxidative stress biomarkers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 697–704. doi:10.1016/j.etap.2014.01.018
- Zhang, L., Wu, H., Liu, X., Chen, L., Wang, Q., Zhao, J., You, L., 2012. Molecular cloning and differential expression patterns of sigma and omega glutathione S-transferases from *Venerupis philippinarum* to heavy metals and benzo[a]pyrene exposure. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 30, 413–423. doi:10.1007/s00343-012-1173-0
- Zhao, Q., Pan, L., Ren, Q., Hu, D., 2015. Digital gene expression analysis in hemocytes of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*

in response to low salinity stress. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 400–407. doi:10.1016/j.fsi.2014.11.020

Zhao, X., Yu, H., Kong, L., Li, Q., 2012. Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 7, 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0046244

CAPÍTULO 3

3. RESPOSTAS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS DO SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE OSTRAS *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) EXPOSTAS A PIRENO E FLUORENO.

Flávia Lucena Zacchi¹; Marília Nardelli Siebert¹; Jacó Joaquim Mattos²; Fabrício Flores-Nunes¹; Ísis Mayna Martins dos Reis¹; Guilherme de Toledo-Silva¹; Clei Endrigo Piazza¹; Márcia Caruso Bicego³; Satie Taniguchi³; Silvio Tarou Sasaki³; Afonso Celso Dias Bainy¹

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica - LABCAI, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

²Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola - NEPAq, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

³Laboratório de Química Orgânica Marinha - LABQOM, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.

*Este capítulo será submetido à revista **Aquatic Toxicology**, juntamente com resultados apresentados na tese da doutoranda **Marília Nardelli Siebert do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFSC** conduzidos com a espécie *Crassostrea gigas* (SIEBERT, 2017). O desenho experimental foi o mesmo com a finalidade comparativa de respostas entre as duas espécies (*C. brasiliana* e *C. gigas*).

3.1. Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compõem uma classe de poluentes orgânicos altamente distribuídos nos ambientes aquáticos. A exposição aos HPAs causa riscos à saúde animal, uma vez que estes possuem potencial carcinogênico, mutagênico e/ou teratogênico. Ao entrar na célula, sua metabolização ocorre a partir da ativação de enzimas específicas que participam das reações de biotransformação. Com o objetivo de avaliar as respostas moleculares e de enzimas de biotransformação de HPAs, ostras *Crassostrea brasiliana* foram expostas a duas concentrações de pireno ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) e fluoreno ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$), por 24 h e 96 h. O tempo de meia-vida dos HPAs foi quantificado por fluorescência na água dos aquários de exposição. Os níveis de transcrição de genes de biotransformação de fase I (*CYP1-like*; *CYP2-like*; *CYP2A1* e *CYP356A1-like*) e fase II (*GST Ω -like*; *GSTm-like* e *SULT-like*) e atividade EROD, GST e GSTm foram avaliados nas brânquias. O tempo de meia-vida do pireno ($100 \mu\text{g.L}^{-1} = 2 \text{ h e } 12 \text{ min}$) na água, mais baixo do que o do fluoreno ($100 \mu\text{g.L}^{-1} = 5 \text{ h e } 54 \text{ min}$), pode estar relacionado à maior lipofilicidade do pireno, facilitando sua entrada no meio intracelular através da membrana plasmática. Após exposição ao fluoreno, houve apenas aumento no nível de transcritos do gene *CYP2A1*, em $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (96 h). Nas ostras expostas ao pireno, houve aumento dos níveis de transcritos de *CYP2A1* (24 e 96 h); *GST Ω -like* (24 e 96 h) e *SULT-like* (24h) em $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de todos os genes avaliados em $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 24 h de exposição. Além disso houve aumento da atividade EROD e GSTm (96 h), sugerindo uma importante participação das enzimas e genes relacionados ao metabolismo de biotransformação de fases I e II do pireno. Os resultados contribuem na busca de biomarcadores de contaminação por HPAs em *C. brasiliana* e evidenciam uma possível participação destes genes e enzimas no metabolismo de biotransformação do pireno. Além disso, sugerem a participação do gene *CYP2A1* no processo de biotransformação de HPAs em brânquias de *C. brasiliana*.

Palavras-chave: ostra do mangue, HPAs, biotransformação, qPCR, atividade enzimática.

3.2. Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a class of widely distributed organic pollutants in aquatic environments. PAHs affect organisms due to its carcinogenic, mutagenic and/or teratogenic characteristics. Once the PAHs enter the cell, they require a multistep metabolic activation by specific enzymes that participate in biotransformation reactions. The aim of this study was to evaluate biochemical and molecular biotransformation responses of the oyster *Crassostrea brasiliana* exposed to pyrene (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) and fluorene (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$), after two time periods of exposure (24 h e 96 h). The half-life times of both PAHs were quantified by fluorescence in the aquaria exposure water and the transcription levels of phase I (*CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2A1* and *CYP356A1-like*) and phase II (*GST-like*, *GSTM-like* and *SULT-like*) biotransformation genes, EROD, GST and GSTm activity, were evaluated in gills. The half-life time of pyrene (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ = 2 h and 12 min) in water was lower than fluorene (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ = 5 h and 54 min). These results might be related to the higher lipophilicity of pyrene, facilitating its influx through the plasma membrane into the intracellular medium. After fluorene exposure, transcript levels of *CYP2A1* gene were higher in 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (96 h). Transcript levels of all genes were higher in oysters exposed to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of pyrene (24 h). Besides, *CYP2A1* (24 and 96 h); *GST Ω -like* (24 and 96 h) and *SULT-like* (24h) were higher in oysters exposed to pyrene 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. EROD and GSTm activities were higher in oysters exposed to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of pyrene (96 h). These results suggest an important role of phase I and II biotransformation genes and enzymes in pyrene metabolism. The study contributes to the identification of new biomarkers of PAHs contamination in *C. brasiliana*. Also evidences a possible participation of these genes and enzymes in pyrene biotransformation metabolism. In addition, it suggests the participation of *CYP2A1* gene in the biotransformation process of PAHs in gills of *C. brasiliana*.

Keywords: biotransformation, enzymatic activity, mangrove oyster, PAHs, qPCR.

3.3. Introdução

Formados a partir da união de dois ou mais anéis benzênicos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compõem uma classe de poluentes orgânicos altamente distribuídos nos ambientes aquáticos (Kim et al., 2009; Latimer e Zheng, 2003; Lazartigues et al., 2010). Sua presença nestes ambientes está relacionada a fontes antropogênicas (processos de combustão incompleta de materiais orgânicos, descarga ou derramamento de petróleo bruto ou produtos petrolíferos) (Dahle et al., 2003; Kaushik e Haritash, 2006), ou naturais (incêndios florestais, infiltrações naturais de petróleo, atividades vulcânicas e conversão de biomoléculas precursoras presentes no sedimento) (Fernandes et al., 1997; Opuene et al., 2007; Tan et al., 1996). Essa diversidade de fontes resulta em misturas complexas de grande variedade de HPAs em diferentes concentrações (Li et al., 2015). Sua persistência no ambiente está diretamente relacionada ao aumento do peso molecular e, conseqüentemente, ao número de anéis benzênicos (Haritash e Kaushik, 2009). São compostos altamente lipofílicos e sua solubilidade em água diminui na medida em que o número de anéis benzênicos em sua composição aumenta (Kim et al., 2013). A exposição aos HPAs causa riscos à saúde animal, e alguns, além de tóxicos, possuem característica carcinogênica, mutagênica e/ou teratogênica (Kim et al., 2013). A carcinogenicidade desses compostos está associada à complexidade da molécula, ou seja, ao número e conformação dos anéis benzênicos. (Boström et al., 2002).

Após a entrada dos HPAs na célula, sua metabolização ocorre a partir da ativação de enzimas específicas que participam das reações de biotransformação. O processo de biotransformação dos HPAs ocorre basicamente em duas fases. A fase I envolve enzimas como as do complexo Citocromo P450 (CYPs), Epóxido hidrolases (EH) e NAD(P)H quinona oxidoreduases (NQO1), que participam do primeiro processo de ativação dos HPAs, catalisando múltiplas reações e gerando metabólitos de natureza eletrofílica, como fenóis, quinonas, dióis, epóxidos e diol epóxidos (Omiecinski et al., 2011; Straif et al., 2005). Esses metabólitos gerados, além de apresentarem características carcinogênicas e/ou tóxicas, ainda não são hidrossolúveis o suficiente para serem excretados da célula (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). Em função disso, precisam ser conjugados com outras moléculas. Esse processo de conjugação é catalisado pelas enzimas de biotransformação de fase II, como as Glutathione S-transferases (GSTs) e Sulfotransferases (SULTs) (Ambrosone e Tang, 2009). Após o processo de biotransformação (fases

I e II), os metabólitos de HPAs, agora mais hidrossolúveis, podem ser transportados para o meio extracelular no metabolismo de fase III, por proteínas de membrana componentes do sistema de resistência a múltiplos xenobióticos (*multixenobiotic resistance* – MXR) (Luckenbach e Epel, 2008). Respostas em níveis moleculares e enzimáticos relacionadas ao sistema de biotransformação de HPAs vêm sendo amplamente estudadas em ostras (Dos Reis et al., 2015; Ertl et al., 2016; Jenny et al., 2016; Lüchmann et al., 2011; 2014; 2015; Pessatti et al., 2016; Zacchi et al., 2017).

A ostra do mangue *Crassostrea brasiliana* (sin. *Crassostrea gasar*, Lazoski et al., 2011) é uma espécie cosmopolita da costa brasileira, de hábito sésil, filtradora, e capaz de acumular contaminantes ambientais em seus tecidos. Essas características tornam vantajoso o uso de *C. brasiliana* como organismo sentinela e biomonitor em estudos de biomonitoramento ambiental (Amaral e Simone, 2014; Lazoski et al., 2011; Lüchmann et al., 2011, 2014, 2015; Pie et al., 2006). Recentemente, a atividade EROD, avaliada como método de quantificação *in vitro* da atividade enzimática de CYP1, foi detectada e caracterizada em brânquias de *C. brasiliana* (Siebert et al., 2017a). Além disso, alterações bioquímicas e moleculares do sistema de biotransformação foram relatadas em *C. brasiliana* expostas à fração solúvel do óleo diesel (Lüchmann et al., 2011) e ao HPA fenantreno (Dos Reis et al.; 2015; Lüchmann et al., 2011, 2015; Zacchi et al., 2017).

O fluoreno e o pireno são HPAs compostos por três e quatro anéis, respectivamente. O fluoreno está presente na maioria dos tipos de petróleos e é um composto amplamente utilizado na indústria farmacêutica e na produção de pigmentos, corantes, pesticidas e plásticos (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). Em função disso, é um HPA comumente identificado em ambientes aquáticos e sedimentos de ambientes marinhos e de água doce (Alegbeleye et al., 2017; Casellas et al., 1997; Fernandez et al., 1992; Grifoll et al., 1992; Muangchinda et al., 2017). Problemas no crescimento, reprodução e alterações bioquímicas foram observados em peixes (Finger et al., 1985; Kopecka-Pilarczyk e Correia, 2009; Sinaei, 2013; Thomas et al., 1981) crustáceos e algas verdes (Finger et al., 1985) expostos ao fluoreno.

A presença do pireno em ambientes aquáticos está associada a atividades antropogênicas como a combustão incompleta de combustíveis fósseis e a produção industrial de pigmentos (Abdel-Shafy e Mansour, 2016; Guo et al., 2007; Sereshk e Bakhtiari, 2014; Yancheshmeh et al., 2014). Embora menos tóxico do que alguns HPAs, como o carcinogênico benzo[a]pireno, o pireno é um composto modelo em estudos de

degradação biológica e metabolização de HPAs (Beach et al., 2010; Ravelet et al., 2000). Em peixes expostos ao pireno, foram observadas alterações bioquímicas e moleculares (Kopecka-Pilarczyk e Correia, 2009; Krasnov et al., 2005; Oliveira et al., 2012; Shirdel et al., 2016), danos lipídicos, aumento de mortalidade e problemas natatórios (Oliveira et al., 2012). Em invertebrados, alterações nas taxas de alimentação e reprodução foram observadas em copépodes (Jensen et al., 2008) e alterações bioquímicas e aumento da peroxidação lipídica foram demonstrados em ostras (Xie et al., 2017).

Nesse estudo, respostas relacionadas ao sistema bioquímico e molecular de ostras *C. brasiliana* foram avaliadas após exposição aos HPAs pireno e fluoreno. Para isso, foram analisados os níveis de transcritos de genes e a atividade de enzimas envolvidos no metabolismo de biotransformação de fase I e II.

3.4. Material e métodos

3.4.1. Desenho experimental e exposição dos animais ao pireno e fluoreno

Ostras *Crassostrea brasiliana* adultas ($6,4 \pm 0,7$ cm) foram adquiridas em um cultivo comercial localizado no Ribeirão da Ilha, em Florianópolis, Santa Catarina, Sul do Brasil, e transportadas até o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC). Cento e vinte ostras foram aclimatadas durante sete dias em um tanque de 150 litros, em sistema de recirculação contínua e mantidas em água com salinidade (25 ‰), temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1,1^{\circ}\text{C}$), pH ($7,8 \pm 0,1$), amônia ($<0,25$) e fotoperíodo (12h : 12h) controlados. Durante toda a aclimação, a alimentação foi realizada com ração comercial de microalgas *Microbe Lift Phyto Plus-B*, na concentração de $200 \cdot 10^6$ células.ostra⁻¹, a cada 36 h: o sistema de recirculação era desligado, a ração adicionada e após 2 h, o sistema era religado. Ao término do período de aclimação, as ostras foram alimentadas por 2 h e distribuídas em 18 aquários de 18 litros de água (seis animais por aquário). O experimento foi conduzido em triplicata, sendo três aquários controle, três aquários de exposição ao pireno a uma concentração de $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P50), e três aquários de exposição ao pireno a uma concentração de $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P100) para o tempo de 24 h, e mais três aquários controle, três aquários P50, e três aquários P100, para o tempo de 96h (Figura

Suplementar 1A). O experimento de exposição ao fluoreno foi realizado uma semana após o término da exposição com pireno. Cento e vinte ostras foram adquiridas do mesmo local já descrito, e os animais foram aclimatados e expostos nas mesmas condições. Entretanto, as concentrações de fluoreno utilizadas foram: $100\mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e $200\mu\text{g.L}^{-1}$ (F200) (Figura Suplementar 1B).

Os HPAs (Pireno 185515, 98% de pureza, Sigma-Aldrich; e Fluoreno 128333, 98% de pureza, Sigma-Aldrich), foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados aos aquários de exposição até alcançar as concentrações nominais já descritas e a concentração final máxima de DMSO de 0,002% (v/v). Nos grupos controle, foram adicionados 0,002% (v/v) de DMSO. As concentrações dos HPAs utilizados foram escolhidas baseadas na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - US EPA). Foram escolhidas concentrações de exposição aguda e crônica, em que há a possibilidade de risco ou perigo aos animais e seres humanos em ambientes aquáticos.

Os aquários com aeração individual foram cobertos com tampa de vidro e cada grupo de aquários (controle ou expostos) foram mantidos dentro de caixas de madeira hermeticamente fechadas contendo filtros de vapores orgânicos, para evitar potenciais contaminações dos grupos controle e expostos.

Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração comercial de microalgas *Microbe Lift Phyto Plus-B*, na concentração de 200.10^6 células.ostra⁻¹, a cada 36 h. Os aquários eram esvaziados, enchidos com água limpa, a alimentação era oferecida. Após 2 h de alimentação, os aquários eram esvaziados, enchidos novamente com água limpa, e os HPAs (PIR ou FLU) nas respectivas concentrações, ou DMSO nos grupos controle, eram diluídos na água dos aquários. A alimentação foi realizada de maneira com que os animais fossem coletados sempre 24 h depois da oferta da ração, de acordo com a Figura Suplementar 2.

No final dos tempos de exposição, quatro ostras de cada aquário ($n=12$) foram dissecadas e as brânquias foram removidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para a realização das análises moleculares e bioquímicas.

Ao final do período de aclimação (controle) e após 24 h e 96 h de exposição (controle e grupos expostos), duas ostras de cada aquário ($n=6$) foram agrupadas para a realização das análises químicas de bioconcentração de PIR ou FLU.

3.4.2. Concentração de PIR e FLU na água

A concentração de PIR e FLU na água de cada aquário controle ou exposto foi mensurada por fluorimetria durante as primeiras 24 h de exposição. A depleção de pireno e fluoreno foi avaliada em um aquário para cada HPA contendo as mesmas condições dos grupos expostos, sem ostras. Um mL de água de cada aquário foi amostrado e imediatamente quantificado por leitura fluorimétrica (Pireno: 270 nm excitação / 384 nm emissão; Fluoreno: 258 nm excitação / 313 nm emissão) em espectrofluorímetro (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e transformadas em concentração de cada um dos HPAs a partir de uma diluição seriada de 2 mg. L⁻¹ PIR ou FLU como curva padrão de referência. As amostras foram coletadas a cada 15 min durante a primeira hora de exposição; a cada 30 min durante as 2 h subsequentes; a cada hora durante as 8 h subsequentes e após 24 h. O tempo de meia vida dos HPAs devido ao consumo e à depleção nos aquários com ostras foi calculado baseado nas respectivas equações exponenciais.

3.4.3. Análise dos níveis de PIR e FLU nos tecidos moles de *C. brasiliiana*

As análises dos níveis de PIR e FLU nos tecidos moles de *C. brasiliiana* foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP). Amostras de 1 g de ostras liofilizadas (Thermo Savant, modulyoD lyophilizer, Waltham, MA, USA) foram extraídas, de acordo com MacLeod et al. (1985), com pequenas modificações, em soxhlet com n-hexano e diclorometano 50% (v/v). Previamente à extração, padrões internos (surrogate), naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, d₁₀-fenantreno, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂ foram adicionados às amostras, ao branco de amostra, e ao material de referência (SRM 2974a – Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue – *Mytilus edulis*). Após a extração, as amostras foram purificadas em coluna cromatográfica de sílica. Para a realização de uma purificação complementar, as amostras foram injetadas em HPLC com duas colunas de exclusão. As amostras foram concentradas e o padrão interno benzo(b)fluoranteno-d₁₂ foi adicionado. O extrato foi injetado em um cromatógrafo gasoso equipado com um espectrômetro de massa (GC/MS) (6890/5973, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com o modo de aquisição SIM (*Selective Ion Monitoring*). A identificação dos HPAs foi feita a partir da comparação dos tempos de retenção com os padrões de referência e a quantificação foi calculada através da razão

entre os surrogates e os compostos de interesse, baseada nas curvas de calibração ajustadas por ao menos cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

3.4.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa

O RNA total das brânquias ($n=10$) foi isolado com o uso do reagente Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Cem miligramas de brânquias foram adicionados a 1 mL de Qiazol e rapidamente homogeneizados em Tissue-Tearor (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). A concentração e pureza do RNA total extraído foram verificadas em Espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Para cada amostra, 1 μ g de RNA total foi tratado com DNase e submetido à reação de transcrição reversa com o uso do kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen). As amostras foram diluídas e armazenadas a -20° C. Para as reações de PCR quantitativo (qPCR) foi utilizado o kit QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen) e foram utilizados 100 ng de cDNA de cada amostra e 1 μ M de cada iniciador em um volume final de reação de 20 μ L.

3.4.5. Reações de qPCR

As sequências nucleotídicas foram selecionadas a partir da base de dados gerada pela análise do transcriptoma de brânquias e glândulas digestivas de *C. brasiliensis* (Lüchmann et al., 2015). Os iniciadores usados nas reações de qPCR foram desenhados com o auxílio do *software* Primer Quest, disponível em www.idtdna.com (IDT), seguindo os parâmetros: (a) *primer size*: mínimo (mín) 18, ótimo (opt) 24 e máximo (máx) 28; (b) *primer Tm*: 55 (mín), 60 (opt), 65 (máx); (c) *primer GC%*: 45 (mín), 50 (opt), e 55 (máx); (d) *amplicon size*: 80 (mín), 130 (opt), 200 (máx); aceitando máximo de diferença de *Tm* (*Max Tm difference*) de um grau Celsius. Os genes selecionados e seus respectivos pares de iniciadores estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Genes selecionados e suas respectivas sequências de iniciadores e tamanhos de amplicon.

Símbolo	Nome do Gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)
Genes normalizadores usados			
<i>28S-like</i>	<i>Subunidade Ribossomal 28</i>	F - CCC GAA GCC AAA CAC ATT CAA GTG G R - GGC TTT CCA TTG CGG TCA CCT TAG	131
<i>βACT-like</i>	<i>β-Actina</i>	F - TTG GTG ACG ATG CCG TGT TCA ATG G R - CCC AGA CAT CAG GGT GTT ATG GTT GGT ATG	122
<i>EF-like</i>	<i>Fator de Elongação</i>	F - ATT GAC CAG AGA ACC ATC GCC AAG T R - ACG CTC AGC CTT GAG TTT GTC CAA TA	102
<i>GAPDH-like</i>	<i>Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase</i>	F - CAG TCC TTG TTA CTG GGT CCA TCT AC R - TGT CTA GCT CCT CTT GCG AAA GTT ATT C	122

Continuação...			
Simbolo	Nome do Gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)
Genes de interesse			
<i>CYP1-like</i>	<i>Citocromo P450 família 1</i>	F - CCA GTG GGA ATC ACC AGA CAA ACC AGA A R - AGG AGG AGC TTC AGG CTG ACG AA	94
<i>CYP2A1</i>	<i>Citocromo P450 2 AU 1</i>	F - AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC R - TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA	158
<i>CYP2-like2</i>	<i>Citocromo P450 família 2</i>	F - CGC TTC GCA GTC CAA GTT GAC AAA R - ATC GTG TTT GGG TTC AGG TAT GCG	136
<i>CYP356A1-like</i>	<i>Citocromo P450 - 356A1</i>	F - TGT TCA GGC CCA ACA ACT CTG TCA R - GGG AGT GGA CTC AAC CAG ATT CAC AA	114
<i>GSTQ-like</i>	<i>Glutathiona-S-transferase ômega</i>	F - GGC GTA GGG ACA GAT CCG ATT AC R - AGG AGC TGA AAT GCC GAC TCA AA	104
<i>GSTM-like</i>	<i>Glutathiona-S-transferase microsomal</i>	F - GCA TTG TCT GGT GTG GTT TGG TGT R - CCT GAG AGT ATG ATG CAG CTT GCA GA	198
<i>SULT-like</i>	<i>Sulfotransferase 1C4</i>	F - CAC CTG TTA CCT CGC CAT ACT CCA R - ACT ACC ATG TCC TTC ATC AGG TCC C	149

Os níveis de transcritos dos genes selecionados foram analisados nas brânquias das ostras, por qPCR, em termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para assegurar a ausência de produtos não específicos e dímeros, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2% e os produtos da amplificação de cada par de iniciadores foram sequenciados. A eficiência do qPCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores e determinada a partir de uma curva de calibração de cDNA, preparada a partir de uma diluição seriada (400 ng/reacção; 200 ng/reacção; 100 ng/reacção; 50 ng/reacção e 25 ng/reacção). Para as análises, foram utilizados os genes em que as curvas apresentaram um R^2 maior ou igual a 0,99 e eficiência entre 98% e 100%. Para testar e escolher os genes de referência foi utilizado o método 2^{-Cq} (Schmittgen e Livak, 2008). Para a normalização dos dados, foram utilizados os genes de referência: *Ribossomal 28S-like (28S-like)* e *β Actina-like (β ACT-like)* para o experimento do PIR e os genes *Elongation Factor-like (EF-like)* e *Gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase-like (GAPDH-like)* para o FLU. A média geométrica dos valores de Ct destes dois genes foi calculada, para cada HPA. Para os genes de interesse, foi aplicado o método $2^{-\Delta Cq}$ (Schmittgen e Livak, 2008). Todos os dados foram relativizados pelos respectivos grupos controle de cada experimento.

3.4.6. Atividades das enzimas de biotransformação

Imediatamente após a dissecação dos animais, 500 mg de tecido por amostra ($n=10$) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, contendo 0,5 M sacarose; 0,15 M KCl; 1 mM DTT e 0,1 mM PMSF, na proporção de 1:5 (p/v). O homogenenato foi centrifugado a 9000 xg por 30 minutos a 4°C, seguido de ultracentrifugação do sobrenadante a 100.000 xg por 70 minutos a 4°C. A partir desse processo, o sobrenadante foi estocado em freezer -80°C para as análises enzimáticas de GST total e os microsomas foram gentilmente ressuspendidos com 500 μ L do tampão de homogeneização sem DTT e PMSF. As amostras foram submetidas a nova ultracentrifugação a 100.000 xg por 20 min a 4°C. Finalmente, a fração microsomal foi diluída em tampão de microsoma (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 0,15 M KCl, 20% glicerol). A atividade 7-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) foi analisada imediatamente após a obtenção da fração microsomal, para evitar a perda de atividade após congelamento e descongelamento.

A determinação da atividade EROD foi realizada de acordo com Siebert e colaboradores (2016), a partir da quantificação da Resorufina

quantificada em espectrofotômetro com excitação a 530 nm, emissão a 585 nm, cutoff a 550 nm e alta PMT por 1 h, com intervalos de leitura de 1 min. A determinação da atividade da Glutathione *S*-transferase total e microsomal (GST e GSTm) foi realizada no sobrenadante e fração microsomal, respectivamente, segundo o ensaio descrito por Keen e colaboradores (1976), baseado na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH, realizando uma leitura em espectrofotômetro a 340 nm, durante 2 min. Para normalizar as atividades enzimáticas quantificadas, o conteúdo total de proteínas presentes nas frações sobrenadantes e microsomais foi determinado pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976) com o kit BioRad™ *protein assay*, de acordo com as instruções do fabricante e utilizando soro albumina bovina como padrão.

3.4.7. Estatística dos dados

O teste de Grubb foi aplicado para detectar os *outliers*, e a normalidade e homocedasticidade dos dados foram avaliadas através dos testes de D'Agostino e Pearson e Levene, respectivamente. Quando necessários, os dados foram normalizados utilizando transformação logarítmica ($Y = \log(Y)$) ou função inversa ($Y = 1/Y$). Em dados normais e homocedásticos com ou sem transformação, foram aplicados testes de ANOVA de uma via seguidos de *post-test* de Tukey, com a finalidade de comparação entre o grupo controle e os grupos expostos, em cada HPA e tempo de exposição. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas com o auxílio dos *softwares* Statistica 7 e GraphPad Prism 5.0.

3.5. Resultados

3.5.1. Níveis de PIR e FLU na água dos aquários e em tecidos de *C. brasiliensis*

Após 24 h de exposição, os níveis de PIR na água dos aquários com ostras decresceram de $61,5 \pm 5,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $1,4 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ (97,1%) no grupo P50 e $101,6 \pm 2,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $5,6 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (94,5%) no grupo P100. Nos aquários sem ostra, os níveis de PIR decresceram de $56,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $38,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (32,4%) no grupo P50 e de $98,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $66,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (32,7%) no grupo P100.

Para o FLU, após 24h de exposição, os níveis na água dos aquários com ostras decresceram de $103,3 \pm 1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $18,5 \pm 1,8 \mu\text{g.L}^{-1}$

(82,1%) no grupo F100 e $202,1 \pm 5,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $35,8 \pm 2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ (82,3%) no grupo F200. Nos aquários sem ostra, os níveis de FLU decresceram de $107,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $56,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (47,4%) no grupo F100 e de $192,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $120,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (37,7%) no grupo F200.

Nos aquários controle, sem a adição de PIR ou FLU, os valores permaneceram estáveis, iguais a zero (Figura 1).

Os tempos de meia vida do PIR nos aquários com ostras foram de 2 h e 30 min (P50) e de 2 h e 12 min (P100). Os tempos de meia vida do FLU foram de 5 h e 54 min (F100) e de 5 h e 30 min (F200), nos aquários com ostras. Nenhuma mortalidade foi observada nos grupos controles ou expostos ao longo do experimento.

Nos grupos controle, os valores de PIR observados nos tecidos de ostra foram 0,006; 0,025 e 0,008, $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco nos tempos zero, 24 h e 96 h, respectivamente. Nos grupos expostos após 24 h, os valores foram $37,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (P50) e $54,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (P100). Após 96 h de exposição, os valores foram $72 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (P50) e $132,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (P100) (Figura 2A).

Os valores de FLU não foram detectados nos tecidos de *C. brasiliiana* do grupos controle (T0 e 24 h) e foram $0,006 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco em 96 h. Nos grupos expostos após 24 h, os valores foram $6,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (F100) e $9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (F200). Após 96 h de exposição, os valores foram $12,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (F100) e $24,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (F200) (Figura 2B).

Figura 1. Concentração de pireno e fluoreno medidos por fluorescência na água dos aquários com (Consumo) ou sem (Depleção) ostras *Crassostrea brasiliiana*, durante 24 h de exposição: (A) Experimento de exposição ao Pireno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P100) e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P50) e Controle com DMSO, sem ostras; (B) Experimento de exposição ao Fluoreno 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F200) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e Controle com DMSO, sem ostras.

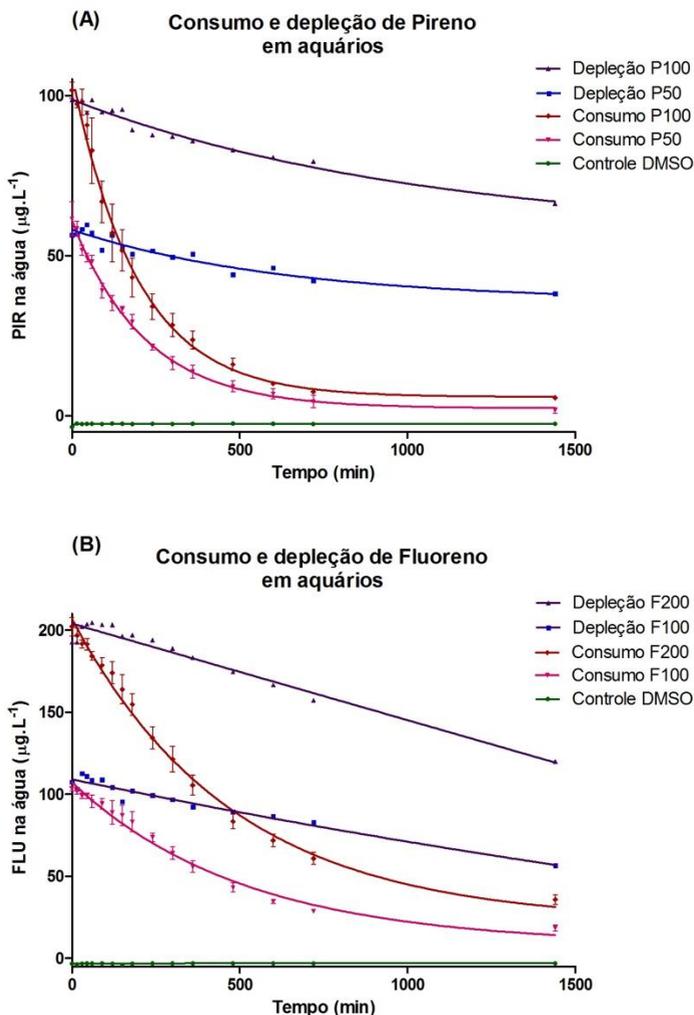
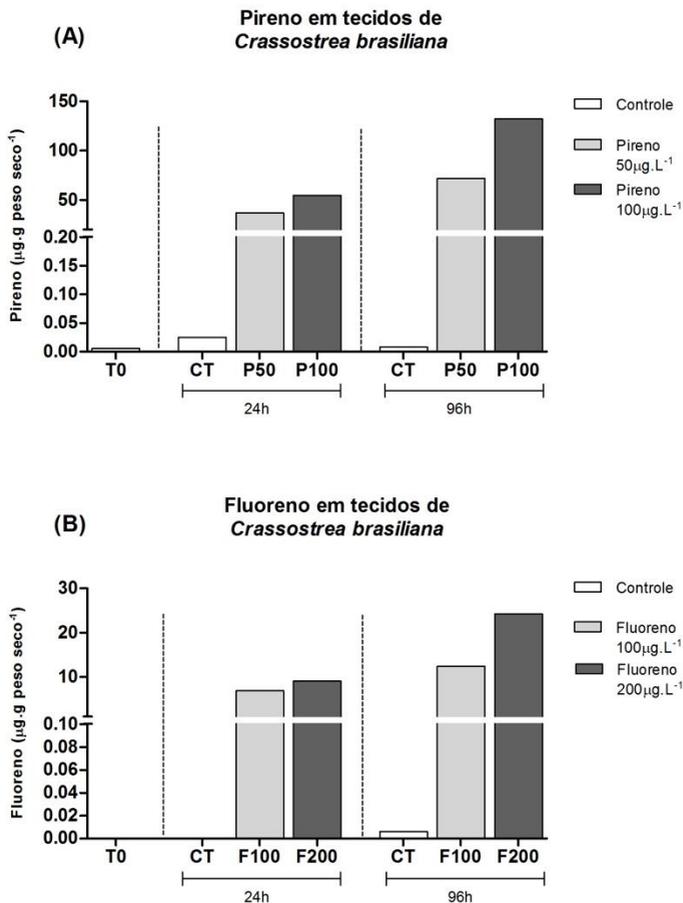


Figura 2. Concentração de pireno (A) e fluoreno (B) ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos moles de *Crassostrea brasiliana* em tempo zero (T0), 24 e 96 horas de exposição: controle (CT); pireno $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P50) e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P100); fluoreno $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (F200).



3.5.2. Nível de transcritos de genes de biotransformação

Em ostras *C. brasiliiana* expostas ao PIR, houve diferença nos níveis de transcritos do gene *Citocromo P450 1-like (CYP1-like)* em 24 h, 1,5 vezes maiores no grupo P100 comparado ao controle (Figura 3A). Os níveis de transcritos do gene *Citocromo P450 2A1 (CYP2A1)* (Figura 3B) foram mais altos no grupo P50 e P100 comparados ao controle em 24 h (2,2 vezes e 3,8 vezes, respectivamente) e no grupo P100 comparado ao controle, em 96 h (1,8 vezes). Para os genes *Citocromo P450 2-like (CYP2-like)* (Figura 3C) e *Citocromo P450 356A1-like (CYP356A1-like)* (Figura 3D) houve diferença entre o grupo P100 e o controle, em 24 h de exposição (2,2 vezes e 1,8 vezes, respectivamente). O gene *Glutathione S-transferase ômega-like (GST Ω -like)* (Figura 3E) apresentou diferença significativa nos níveis de transcritos do grupo P100 comparado ao controle em 24 h (1,6 vezes) e P50 comparado ao controle em 96 h (1,6 vezes). Os níveis de transcritos de *Glutathione S-transferase microsomal-like (GSTm-like)* (Figura 3F) foram mais altos no grupo P100 comparados ao controle em 24 h (2,2 vezes) e os níveis de transcritos de *Sulfotransferase-like (SULT-like)* (Figura 3G) apresentaram-se mais altos nos grupos P50 e P100 comparados ao controle em 24 h de exposição (2 vezes e 2,5 vezes, respectivamente).

Com relação às ostras expostas ao FLU somente houve diferença nos níveis de transcritos do gene *CYP2A1* em 96 h, no grupo F200 comparado ao grupo controle (2,3 vezes) e ao grupo F100 (2,1 vezes) (Figura 4B). Não houve diferenças significativas nos níveis de transcritos dos genes: *CYP1-like* (Figura 4A), *CYP2-like* (Figura 4C), *CYP356A1-like* (Figura 4D), *GST Ω -like* (Figura 4E), *GSTm-like* (Figura 4F) e *SULT-like* (Figura 4G).

Figura 3. Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP1-like*, (B) *CYP2AU1*, (C) *CYP2-like*, (D) *CYP356A1-like*, (E) *GST Ω -like*, (F) *GSTM-like*, (G) *SULT-like* em brânquias de ostras *C. brasiliana* de grupos controles (CT) e expostos ao Pireno: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (P50) e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (P100). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão.

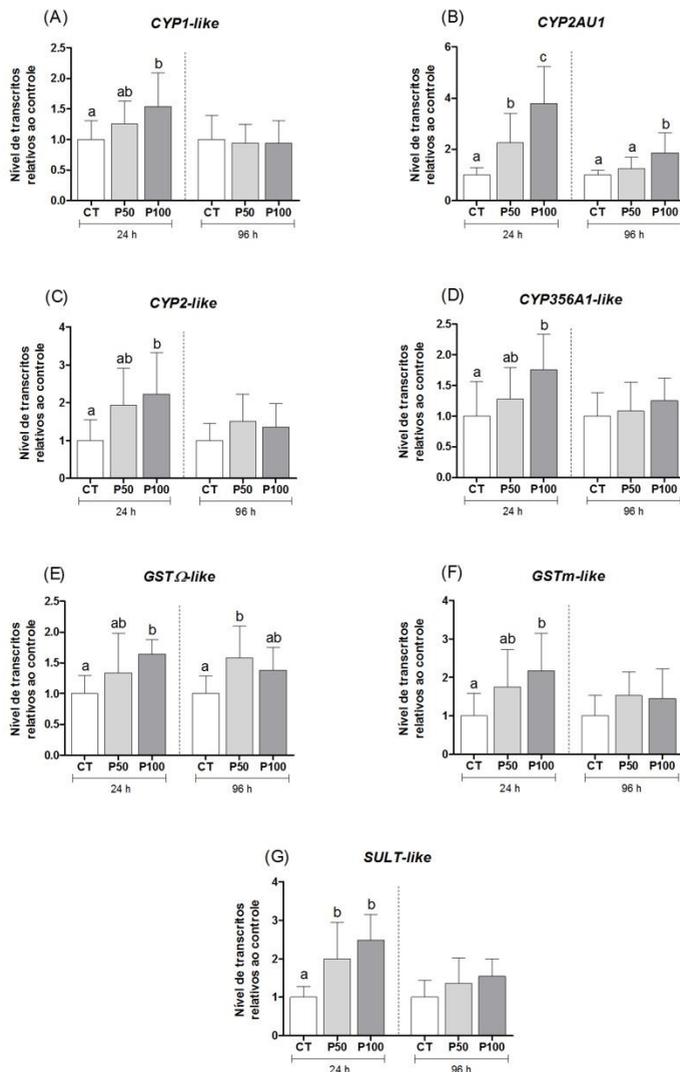
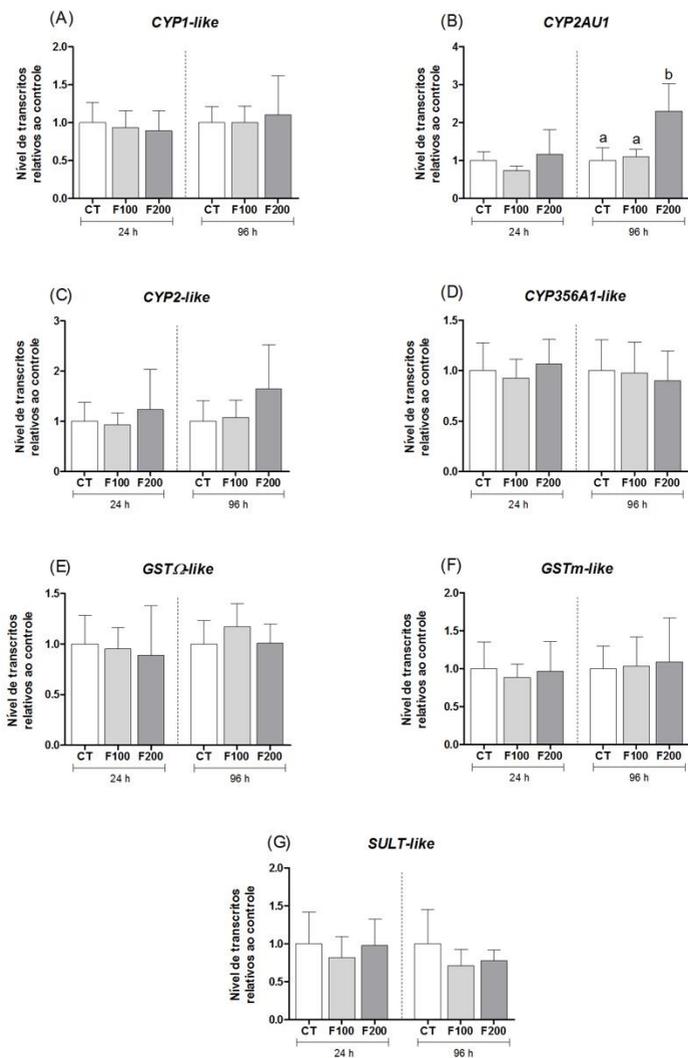


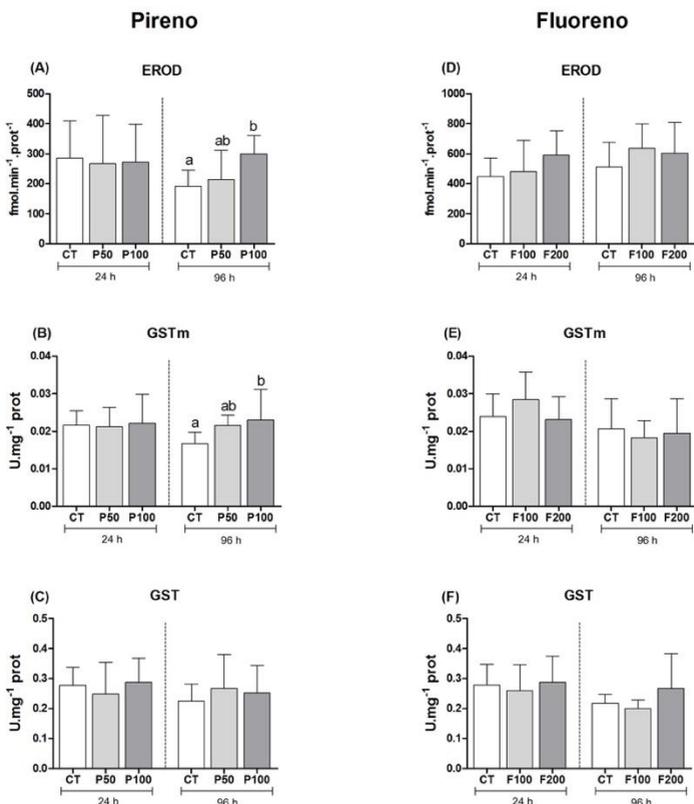
Figura 4. Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP1-like*, (B) *CYP2A1*, (C) *CYP2-like*, (D) *CYP356A1-like*, (E) *GST Ω -like*, (F) *GSTM-like*, (G) *SULT-like* em brânquias de ostras *C. brasiliana* de grupos controles (CT) e expostos ao Fluoreno: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (F100) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (F200). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão.



3.5.3. Atividade de enzimas de biotransformação

Houve diferença significativa na atividade EROD e GSTm em ostras *C. brasiliana* expostas a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PIR (P100) em 96 h, quando comparadas às ostras do grupo controle. Não houve diferença na atividade da GST em ostras expostas ao PIR, e não houve diferença na atividade das enzimas EROD, GSTm e GST em ostras expostas ao FLU, em 24 h ou 96 h (Figura 5).

Figura 5. Atividade enzimática em 24 h e 96 h em brânquias de ostras *C. brasiliana* de grupos controles (CT) e expostas ao Pireno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P100) e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P50): (A) EROD, (B) GSTm, (C) GST; e ao Fluoreno 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F200) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F100): (D) EROD, (E) GSTm, (F) GST. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão.



3.6. Discussão

Mudanças nos níveis de transcritos e na atividade de enzimas relacionadas ao sistema de biotransformação são comumente utilizadas em estudos ecotoxicológicos que visam avaliar a exposição de organismos aquáticos aos HPAs. Nesse sentido, ostras *Crassostrea brasiliana* foram submetidas a duas concentrações de pireno e fluoreno e respostas relacionadas à exposição a esses HPAs foram verificadas em brânquias, através dos níveis de transcritos de genes e atividade de enzimas de biotransformação de fases I e II. Com o intuito de confirmar o consumo dos HPAs pelas ostras durante o período experimental, a concentração destes foi monitorada na água dos aquários de exposição por fluorescência e análises químicas foram realizadas nos tecidos das ostras, antes da exposição, em 24 h e 96 h após a exposição aos HPAs.

Os níveis de PIR e FLU monitorados ao longo de 24 h de exposição nos aquários contendo ostras, aliados aos resultados das análises químicas nos tecidos, mostraram que houve bioconcentração dos HPAs pelas ostras durante o período de exposição. No entanto, também houve a diminuição dos HPAs nos aquários sem ostras, indicando que há uma depleção desses compostos não associada ao consumo pelos organismos.

Com relação ao tempo de meia vida na água dos aquários com ostras, o tempo mais alto do FLU na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ comparado ao tempo do PIR na mesma concentração ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$), e as maiores concentrações de PIR bioconcentradas nos tecidos, podem estar relacionados à solubilidade desses HPAs em soluções aquosas. A solubilidade do PIR em água é menor do que a solubilidade do FLU, calculadas e demonstradas através da relação de partição octanol-água, sempre mais alta no PIR quando comparada ao FLU (Bruggeman et al., 1982; Miller et al., 1985; Sangster, 1989). Em função da maior lipofilicidade do PIR quando comparado ao FLU, há a tendência de uma maior interação hidrofóbica entre o PIR e a bicamada lipídica da membrana plasmática celular, o que permite a entrada deste HPA mais facilmente no meio intracelular dos organismos expostos, através da membrana plasmática por processo de difusão (Sikkema et al., 1994; 1995). Esse motivo pode estar relacionado também à maior quantidade de respostas bioquímicas e moleculares encontradas no sistema de biotransformação das ostras expostas ao PIR.

Embora ainda desconhecidos os mecanismos metabólicos, sabe-se que os invertebrados marinhos são capazes de biotransformar o pireno. No gastrópode marinho *Buccinum undatum* foram identificados nove

produtos de biotransformação do pireno, incluindo metabólitos hidroxilados e conjugados (Beach et al., 2010). Em *Crassostrea gigas*, o metabólito 1-hidroxipireno foi detectado nos tecidos ao longo de 24 h de exposição ao pireno (Bustamante et al., 2012). A presença desses metabólitos evidencia a ocorrência dos processos de biotransformação de fase I e II em moluscos marinhos.

Após a entrada dos HPAs na célula, sua metabolização ocorre a partir da ativação de enzimas específicas que participam das reações de biotransformação. A fase I de biotransformação envolve a atividade redox das enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP). Os produtos das reações de fase I podem ser substratos das reações de conjugação catalisadas pelas enzimas de fase II, como a Glutathione *S*-transferase e a Sulfotransferase.

Os Citocromos P450 compreendem uma das maiores e mais amplamente distribuídas superfamília de proteínas, encontrados em plantas, bactérias, fungos, animais vertebrados e invertebrados (Nelson, 2011; 2013). Em invertebrados aquáticos, o metabolismo de HPAs como o benzo[a]pireno (B[a]P) e pireno é mediado por enzimas do complexo CYP450 (Rewitz et al., 2006). Ressaltando a importância desse complexo frente à exposição a HPAs, no presente estudo, em brânquias de ostras expostas ao PIR foram observadas diferenças nos níveis de transcritos dos quatro genes *CYP* avaliados: *CYP1-like*; *CYP2-like*; *CYP2AUI* e *CYP356A1-like*.

A família CYP1 está envolvida na detoxificação e bioativação de HPAs em vertebrados (Shimada et al., 1996; Uno et al., 2004). A detoxificação celular dos HPAs realizada por algumas famílias de CYP, incluindo CYP1, é modulada pelo receptor de aril hidrocarboneto (AhR) que está normalmente presente no citosol, em sua forma inativa, em complexo com algumas proteínas, como a proteína de choque térmico (Hsp90) e a proteína 2 associada à co-chaperona X (XAP2). Após a interação com um ligante, por exemplo um HPA, o complexo AhR é translocado para o núcleo, se dissocia das proteínas citoplasmáticas e se associa com o translocador nuclear de AhR (translocador nuclear de AhR: ARNT). O complexo ligante AhR-ARNT atua controlando a expressão de genes específicos, como o *CYP1* (Arukwe e Nordbo, 2008; Du et al., 2015; Hu et al., 2015; Williams et al., 1998). O gene *AhR* foi identificado em vários bivalves como *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012); *Pinctada martensii* (Du et al., 2015); *Chlamys farreri* (Cai et al., 2016); *Mytilus edulis* e *Dreissena polymorpha* (Hahn, 2002); *Ruditapes philippinarum* (Liu et al., 2010) e *Mya arenaria* (Butler et al., 2001). Entre os possíveis ativadores do AhR estão alguns HPAs, incluindo B[a]P, pireno e criseno

(Barron et al., 2004; Billiard et al., 2002; Liu et al., 2010; 2014a; Machala et al., 2001; Vondracek et al., 2007). Ainda, em estudo *in vitro* realizado por Machala e colaboradores (2001), houve ativação do AhR pelo pireno, enquanto o fluoreno não ativou esse receptor.

Em moluscos bivalves, genes *CYP1-like* foram identificados em *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012); *Chlamys farreri* (Guo et al., 2013); *Mytilus edulis* (Zanette et al., 2013), *C. brasiliiana* (Lüchmann et al., 2015) e *Nodipecten nodosus* (Piazza et al., 2016). Em experimentos realizados com mexilhões *Mytilus edulis* (Zanette et al., 2013) expostos a agonistas do AhR e vieiras *Nodipecten nodosus* expostas ao fenantreno, não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos de *CYP1-like* (Piazza et al., 2016). No entanto, Lüchmann e colaboradores (2015) em estudo de um transcriptoma realizado em brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea brasiliiana* expostas a fenantreno, identificaram ativação do nível de transcrição do gene *CYP1A-like*. Esses resultados, aliados ao aumento do nível de transcritos de *CYP1-like* em brânquias da mesma espécie expostas ao pireno (100 µg.L⁻¹, tempo 24 h) no presente trabalho, sugerem a participação dos genes da família *CYP1* na biotransformação de HPAs na espécie *C. brasiliiana*.

Corroborando essa hipótese, houve um aumento da atividade EROD em *C. brasiliiana* expostas ao pireno (100 µg.L⁻¹, tempo 96 h), enzima cuja atividade é amplamente avaliada como método de quantificação *in vitro* da atividade enzimática de CYP (Whyte et al., 2000). Em peixes, a atividade EROD aliada à expressão gênica e catalítica de CYP1A é bem caracterizada e considerada um biomarcador sensível de exposição aos HPAs (Burgeot et al., 1996; Casini et al., 2006; Guo et al., 2016; Holth et al., 2014; Meier, et al., 2010; Stephens et al., 2000; Stegeman et al., 1988; Tollefsen et al., 2008; Van der Oost et al., 2003; Zhu et al., 2008). Recentemente, a atividade EROD foi detectada, caracterizada e relacionada com a atividade CYP1 após testes com diversos inibidores, em brânquias de *C. brasiliiana* (Siebert et al., 2017a). Em moluscos bivalves, a atividade EROD foi correlacionada positivamente com o nível de transcritos de genes *CYP1-like* em brânquias de *C. gigas* (Siebert et al., 2017b). A atividade EROD e a expressão de CYP1A foram detectadas em hemócitos de *Chamelea gallina* expostas a B[a]P (Monari et al., 2009). Em *Chlamys farreri* e *Ruditapes philippinarum* expostos ao B[a]P, a atividade EROD foi relacionada com o aumento de transcritos dos genes *AhR* e *CYP1A1* (Liu et al., 2014a, 2014b; Tian et al., 2013). Em vieiras *Chlamys farreri* expostas ao criseno, a atividade EROD foi relacionada ao aumento da

transcrição de *CYP1A* (Xiu et al., 2015). Nessa mesma espécie exposta ao B[a]P e criseno, o aumento da transcrição de *CYP1A*, *AhR* e *ARNT* foi relacionado à atividade EROD (Guo et al., 2016). No presente trabalho, portanto, a presença do pireno em maior concentração ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) pode ter levado à ativação do sistema AhR-ARNT em *C. brasiliiana*, modulando a transcrição do gene *CYP1-like* em 24 h e promovendo a síntese da isoforma de CYP450 (CYP1), acarretando em um aumento da atividade EROD em 96 h de exposição das ostras submetidas à mesma concentração de pireno.

Em deuterostômios, de equinodermas a mamíferos, a família de CYP2 é a maior e mais diversa família conhecida de CYPs (Goldstone et al., 2006; Nelson et al., 2009). Em mamíferos, os CYP2 são responsáveis pelo metabolismo de compostos estruturalmente diversos como drogas, esteroides e carcinógenos (Kirischian et al., 2011; Lee, 2008). Em peixes, membros da família CYP2 estão envolvidos no metabolismo de compostos endógenos como o ácido araquidônico e hormônios esteroidais; e no metabolismo de compostos exógenos como drogas e fármacos (Goldstone et al., 2010; Schlenk et al., 2008). Em moluscos, os membros da família CYP2 juntamente com os de CYP1, fazem parte do Clã 2. Esse, em análise do genoma de *Crassostrea gigas*, aparece como o maior clã de CYPs, sugerindo um importante papel metabólico destes genes em ostras (Zhang et al., 2012).

Em bivalves, embora o papel metabólico dos genes da família CYP2 ainda não esteja bem estabelecido, diversos trabalhos mostram o aumento de transcritos de genes da família CYP2 em moluscos expostos a HPAs. Vieiras *Chlamys farreri* expostas a B[a]P por três dias apresentaram transcrição diferencial dos genes *CYP2D10* (induzido), *CYP2B5* e *CYP2U1* (reprimidos) (Cai et al., 2014). Em vieiras *Nodipecten nodosus* expostas a fenantreno, por um e quatro dias houve variação na transcrição gênica de *CYP2D20-like* e *CYP2UI-like* (Piazza et al., 2016). Em ostras *Crassostrea brasiliiana* expostas a fenantreno houve aumento na transcrição gênica de *CYP2-like1*, *CYP2-like2* e *CYP2AU1* ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$) e *CYP2-like2* ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Lüchmann et al., 2014). Em outro estudo realizado com *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) em diferentes salinidades, o nível de transcritos do gene *CYP2-like1* foi afetado apenas pela exposição ao HPA (Zacchi et al., 2017). Corroborando esses resultados, no presente trabalho, houve 2,2 vezes mais transcritos do gene *CYP2-like* em *C. brasiliiana* expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ PIR comparadas ao controle, em 24 h.

Interessantemente, para o gene *CYP2AUI* houve diferença nos níveis de transcritos das ostras *C. brasiliana* expostas ao pireno, em 24 h para 50 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e em 96 h para 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Além disso, esse foi o único gene que apresentou diferenças em ostras expostas ao fluoreno (96 h, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Embora pouco se saiba sobre a função biológica de *CYP2AUI*, o nível de transcritos desse mesmo gene em *C. brasiliana* foi afetado após exposição ao fenantreno em brânquias, glândula digestiva, intestino e manto (Dos Reis et al., 2015; Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2017). Somadas a esses estudos com fenantreno, as respostas do gene *CYP2AUI* em ostras expostas a ambas concentrações de pireno (50 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e fluoreno (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) sugerem uma importante participação desse gene no metabolismo de HPAs de *C. brasiliana*.

Em ostras da espécie *C. gigas*, os níveis de transcritos do gene *CYP356A1* têm sido propostos como biomarcadores moleculares de exposição ao esgoto sanitário (Flores-Nunes et al., 2015; Medeiros et al., 2008; Rodrigues-Silva et al., 2015; Toledo-Silva et al., 2008). No presente trabalho, houve diferenças nos níveis de transcritos de *CYP356A1-like* em *C. brasiliana* expostas ao pireno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (24 h). Embora respostas semelhantes tenham sido observadas em *C. brasiliana* exposta ao fenantreno (Lüchmann et al., 2014), são necessários mais estudos envolvendo as respostas de *CYP356A1-like* em ostras expostas a HPAs.

Com relação ao sistema de biotransformação de fase II, as GSTs são enzimas ubíquas encontradas na maioria dos filos animais, envolvidas no sistema de proteção contra uma gama de xenobióticos e subprodutos do metabolismo oxidativo, além de conjugarem uma série de compostos carcinogênicos com o tripeptídeo endógeno glutationa (GSH) (Boutet et al., 2004a; Sharma et al., 2004).

Membros da classe de GSTs ômega (GST Ω) são conhecidos por atuarem na proteção contra o estresse oxidativo celular (Board et al., 2000; Dulhunty et al., 2001), que pode ocorrer quando há um desequilíbrio entre a produção e a remoção ou eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas no processo de biotransformação de HPAs (Kelly, 2003; Regoli et al., 2002). Nesse processo, várias proteínas celulares formam adutos de S-tiol com glutationa e cisteína, que podem inativar funções enzimáticas. Uma das funções descritas para a GST Ω envolve a remoção destes adutos de S-tiol como forma de restaurar as funções enzimáticas celulares (Board et al., 2000; Boutet et al., 2004b; Sheehan et al., 2001).

Em bivalves, os níveis de transcritos de *GST Ω -like* mostraram-se alterados e relacionados à proteção contra estresse oxidativo após exposição aos mais variados tipos de contaminantes: em ostras *Crassostrea gigas* expostas a hidrocarbonetos (Boutet et al., 2004b); esgoto sanitário (Flores-Nunes et al., 2015; Medeiros et al., 2008) e ibuprofeno (Serrano et al., 2015); em *Crassostrea brasiliana* expostas a fenantreno (Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2017) e esgoto sanitário (Pessatti et al., 2016), em *Crassostrea ariakensis* expostas a ficotoxinas (Zou et al., 2015); em vieiras *Nodipecten nodosus* expostas ao fenantreno (Piazza et al., 2016); em moluscos de areia *Venerupis philippinarum* expostos a metais traço e B[a]P (Zhang et al., 2012) e em abalones *Haliotis discus discus* expostos a metais traço (Wan et al., 2009). No presente estudo, houve um maior nível de transcritos do gene *GST Ω -like* nas ostras expostas a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pireno em 24 h, e a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pireno em 96 h. Sugere-se, portanto, uma necessidade de metabolização dos subprodutos da biotransformação do pireno dose-dependente com o passar do tempo de exposição. Em concentração mais alta pode haver um requerimento do aumento nos níveis de transcritos de *GST Ω -like* mais rapidamente. Em concentração mais baixa, pode levar mais tempo para que seja necessário o aumento dos níveis de transcritos de *GST Ω -like*.

As GSTs microssomais (GSTm), também designadas de “proteínas associadas de membrana envolvidas no metabolismo de eicosanoides e glutathiona” (MAPEG, do inglês *Membrane-Associated Protein Eicosanoid and Glutathione*), são proteínas predominantemente localizadas no retículo endoplasmático; fazem parte do sistema de biotransformação do ácido araquidônico (Hayes et al., 2005; Jakobsson et al., 2000; Lüchmann et al., 2015) e podem estar envolvidas na detoxificação de xenobióticos (Hayes et al., 2005; Higgins e Hayes, 2011; Kelner et al., 2000). Como as Glutathionas transferases, as GSTm possuem seletividade por compostos halogenados, como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e alguns hidrocarbonetos insaturados polihalogenados (Johansson et al., 2010). No entanto, somado às atividades glutathiona peroxidase, o papel fundamental da GSTm envolve a proteção celular contra danos causados pelo malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica (Crespo e Sole, 2016; Shimoji et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zou et al., 2015). Um quadro de estresse oxidativo promovido pelo desbalanço de EROs pode levar à peroxidação lipídica e contribuir para a geração de MDA (Shimoji et al., 2017). A expressão do gene *GSTm-like* pode ser, portanto, regulada em situações de estresse oxidativo celular (Hayes et al., 2005; Higgins e Hayes, 2011;

Kelner et al., 2000). A exposição ao pireno causou aumento dos níveis de peroxidação lipídica em peixes (Oliveira et al., 2012) e ostras (Xie et al., 2017). No presente estudo, os níveis de transcritos mais altos de *GSTM-like* em brânquias de ostras expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de pireno em 24 h, seguidos pelo aumento da atividade da GSTm no mesmo grupo (P100) em 96 h de exposição, podem estar relacionados à alta lipofilicidade do pireno, que tende a apresentar uma alta interação hidrofóbica entre esse HPA e camada lipídica da membrana do retículo endoplasmático, aumentando a necessidade de transcrição do gene *GSTM-like* e atividade de GSTm (Sikkema et al., 1994; 1995). Além disso, sugerem uma possível participação da GSTm na proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo pireno. No entanto, são necessários mais estudos que confirmem essa hipótese.

As Sulfotransferases (SULTs) citosólicas pertencem a uma superfamília de enzimas multifuncionais que desempenham um importante papel no metabolismo de fase II de biotransformação. Esse grupo de enzimas catalisa a conjugação de sulfatos, detoxificando e bioativando uma série de xenobióticos e compostos endógenos como hormônios, drogas e contaminantes orgânicos (Chapman et al., 2004; Gamage et al., 2006; Mitra e Audus, 2009; Nagata e Yamazoe, 2000). Foi observada uma predominância de metabólitos de pireno conjugados sulfatados em peixes (*Carassius auratus*; *Corydora aeneus* e *Colisa labiosa*) e no crustáceo *Daphnia magna* expostos a pireno, o que sugere uma importante participação da SULT no processo de biotransformação (Ikenaka et al., 2013; 2006). Em bivalves, ainda não haviam sido demonstradas respostas moleculares que envolvessem o gene da *SULT* frente a exposições ao pireno ou fluoreno. No entanto, concernente a outros HPAs, o aumento na transcrição de *SULT-like* em bivalves foi relatado previamente em vieiras *Chlamys farreri* expostas a B[a]P e criseno (Guo et al., 2016) e em moluscos de areia *Ruditapes phillipinarum* expostos ao B[a]P (Liu et al., 2015). Em ostras da espécie *Crassostrea brasiliana*, houve aumento da transcrição de *SULT-like* após exposição ao fenantreno (Lüchmann et al., 2015; Zacchi et al., 2017) e a um local contaminado por HPAs (Pessatti et al., 2016). De maneira interessante, no presente estudo, o nível de transcritos do gene *SULT-like* (identificada como *SULTIC4-like*) apresentou-se mais alto em *C. brasiliana* expostas a ambas concentrações de pireno (50 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) em 24 h. Embora nenhum resultado tenha sido observado nos níveis de transcritos de *SULT-like* em ostras expostas ao fluoreno, em função da resposta às duas concentrações de PIR, o uso desse gene como potencial

biomarcador de contaminação aquática por HPA deve ser considerado. No entanto, são necessários mais estudos que esclareçam a modulação gênica de *SULT-like* e avaliem potenciais substratos relacionados à atividade enzimática de SULT em *C. brasiliiana*.

3.7. Conclusão

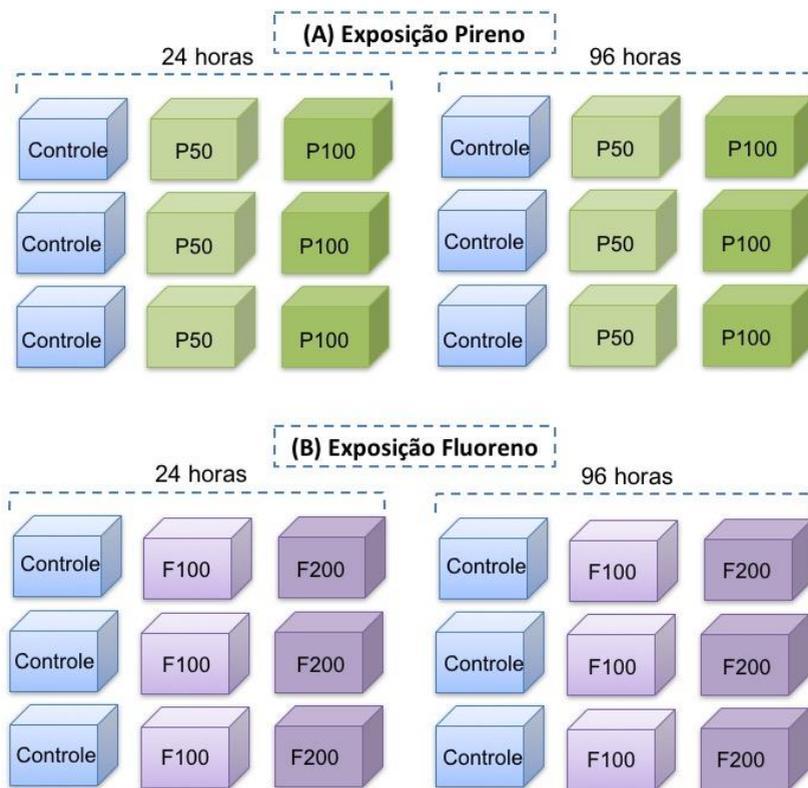
O aumento da atividade enzimática em conjunto com o aumento dos níveis de transcritos dos genes relacionados às fases I e II em brânquias de *C. brasiliiana* evidenciam a atuação do metabolismo de biotransformação do pireno nessa espécie, para as condições testadas.

O aumento dos níveis de transcritos do gene *CYP2A1* em ostras expostas ao pireno e fluoreno sugerem o uso desse gene como potencial biomarcador de contaminação por HPAs em *C. brasiliiana*.

A maior lipofilicidade do pireno em relação ao fluoreno pode estar associada ao menor tempo de meia-vida desse HPA na água dos aquários com ostras e às altas concentrações bioconcentradas nos tecidos, bem como à maior quantidade de respostas observadas nos níveis de transcritos e atividade enzimática em brânquias de *C. brasiliiana*.

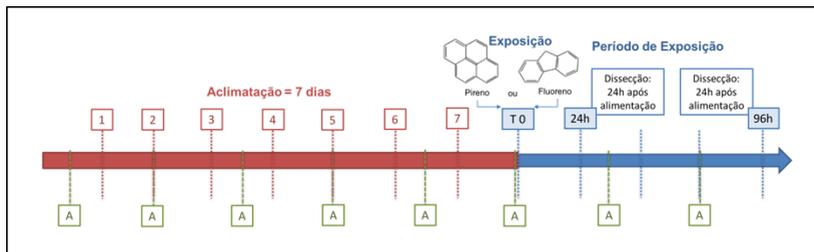
3.8. Material suplementar

Figura Suplementar 1. Desenho experimental das exposições de ostras *C. brasiliana* aos HPAs: (A) Pireno 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P50) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (P100); e (B) Fluoreno 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F100) e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F200). Número de ostras por aquário = 6, em triplicata.



Fonte: ZACCHI, F.L.; SIEBERT, M.N. (Arquivo pessoal).

Figura Suplementar 2. Esquema de linha do tempo para detalhamento de alimentação de ostras *Crassostrea brasiliiana* durante período de aclimatação e exposição ao Pireno ou ao Fluoreno. Durante o período de exposição, ao final de cada alimentação, houve nova diluição do respectivo HPA na água dos aquários. Legenda: Em vermelho, período em dias de aclimatação. Em azul, período de exposição: Tempo zero de exposição (T0); Tempo 24 horas de exposição (24 h); Tempo 96 horas de exposição (96 h). Em verde, momentos em que a alimentação foi fornecida (A).



Fonte: ZACCHI, F.L.; SIEBERT, M.N. (Arquivo pessoal).

3.9. Referências bibliográficas

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egypt. J. Petrol. 25,107-123. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011
- Alegbeleye, O.O., Opeolu, B.O., Jackson, V., 2017. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. Braz. J. Microbiol. 48,314-325. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.027
- Amaral, V.S.D., Simone, L.R.L., 2014. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia : Ostreidae) of Brazil. J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom 94, 1–26. doi:10.1017/S0025315414000058

- Ambrosone, C.B., Tang, L., 2009. Cruciferous vegetable intake and cancer prevention: role of nutrigenetics. *Cancer Prev. Res.* 2,298-300. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0037
- Arukwe, A., Nordbø, B., 2008. Hepatic biotransformation responses in Atlantic salmon exposed to retinoic acids and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB congener 77). *Comp. Biochem. Physiol.* C. 147,470-482. doi:10.1016/j.cbpc.2008.02.002
- Barron, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar. Environ. Res.* 58,95-100. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.001
- Beach, D.G., Quilliam, M.A., Rouleau, C., Croll, R.P., Hellou, J., 2010. Bioaccumulation and biotransformation of pyrene and 1-hydroxypyrene by the marine whelk *Buccinum undatum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29,779-788. doi:10.1002/etc.112
- Billiard, S.M., Hahn, M.E., Franks, D.G., Peterson, R.E., Bols, N.C., Hodson, P.V., 2002. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AhRs). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 133,55-68. doi:10.1016/S1096-4959(02)00105-7
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega Class Glutathione Transferases. *J. Biol. Chem.* 275,24798-24806. doi:10.1074/jbc.M001706200
- Boström, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspec.* 110,451-488. doi:10.1289/ehp.02110s3451
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-

- transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar. Biol.* 146, 53–64 doi:10.1007/s00227-004-1423-6
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene*. 329, 147–157. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bruggeman, W.A., Van Der Steen, J., Hutzinger, O., 1982. Reversed-phase thin-layer chromatography of polynuclear aromatic hydrocarbons and chlorinated biphenyls relationship with hydrophobicity as measured by aqueous solubility and octanol-water partition coefficient. *J. Chromatogr.* 238,335-346. A. doi:10.1016/S0021-9673(00)81319-9
- Burgeot, T., Bocquene, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., Garcia De La Parra, L.M., Pihol-Leskowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131,125–141. doi:10.3354/meps131125
- Bustamante, P., Luna-Acosta, A., Clamens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolism of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere*, 87,944-950. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.049
- Butler, R.A., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E., Van Beneden, R.J., 2001. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benaphthoflavone binding. *Gene*. 278,223-234. doi:10.1016/S0378-1119(01)00724-7

- Cai, Y., Pan, L., Hu, F., Jin, Q., Liu, T., 2014. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene. *Gene*. 551,261–270.
doi:10.1016/j.gene.2014.09.003
- Cai, Y., Pan, L., Miao, J., 2016. Molecular evidence for the existence of an aryl hydrocarbon receptor pathway in scallops *Chlamys farreri*. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 196–197,74–84.
doi:10.1016/j.cbpb.2016.02.006
- Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J.M., Solanas, A.M. 1997. New Metabolites in the Degradation of Fluorene by *Arthrobacter sp.* Strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* 63,819-826.
- Casini, S., Marsili, L., Fossi, M.C., Mori, G., Bucalossi, D., Porcelloni, S., Caliani, I., Stefanini, G., Ferraro, M., Alberti di Catenaja, C., 2006. Use of biomarkers to investigate toxicological effects of produced water treated with conventional and innovative method. *Mar. Environ. Res.* 62,S347–S351, 2006.
doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.060
- Chapman, E., Best, M.D., Hanson, S.R., Wong, C.H., 2004. Sulfotransferases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43,3526–3548. doi:10.1002/anie.200300631
- Crespo, M., Sole, M., 2016. The use of juvenile *Solea solea* as sentinel in the marine platform of the Ebre Delta: in vitro interaction of emerging contaminants with the liver detoxification system. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23,19229e19236.
doi:10.1007/s11356-016-7146-7
- Dahle, S., Savinov, V.M., Matishov, G.G., Evenset, A., Naes, K., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bottom sediments of the Kara Sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay. *Sci. Total Environ.* 306,57-71. doi:10.1016/S0048-9697(02)00484-9
- Dos Reis, I.M.M., Mattos, J.J., Garcez, R.C., Zacchi, F.L., Miguelão, T., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bícigo, M., Cargnin-Ferreira, E., Bairy, A.C.D., 2015. Histological responses and localization of the cytochrome P450

- (*CYP2AUI*) in *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 169, 79-89. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.10.011
- Du, M., Fang, C., Qiu, L., Dong, S., Zhang, X., Yan, C., 2015. Diastereoisomer-specific effects of hexabromocyclododecanes on hepatic aryl hydrocarbon receptors and cytochrome P450s in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 132,24-31. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.049
- Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P., 2001. The Glutathione Transferase Structural Family Includes a Nuclear Chloride Channel and a Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Modulator. *J. Biol. Chem.* 276, 3319–3323. doi:10.1074/jbc.M007874200
- Ertl, N.G., O'Connor, W.A., Brooks, P., Keats, M., Elizur, A., 2016. Combined exposure to pyrene and fluoranthene and their molecular effects on the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquat. Toxicol.* 177,136-145. doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.012
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J., 1997. Aquatic hydrocarbon distributions in the Seine estuary: biogenic polyaromatics and n-alkanes. *Estuaries.* 20,281-290. doi:10.2307/1352343
- Fernandez, P., Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M., Albaigés, J. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal marine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26,817-829. doi:10.1021/es00028a024
- Finger, S.E., Little, E.F., Henry, M.G., Fairchild, J.F., Boyle, T.P. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorence - Part I: Effects of Fluorence on the Survival, Growth, Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests. ASTM International, 1985.
- Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Serrano, M.A., Piazza, C.E., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bícago, M.C., Melo, C.M., Bainy, A.C.D., 2015. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster

- Crassostrea gigas*. Environ. Sci. Pollut. Res. 1-11.
doi:10.1007/s11356-015-4486-7
- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., McManus, M.E., 2006. Human Sulfotransferases and their role in chemical metabolism. Toxicol. Sci. 90,5–22.
doi:10.1093/toxsci/kfj061
- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., Dean, M., Epel, D., Hahn, M.E., Stegeman, J.J., 2006. The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. Dev. Biol. 300,366-84. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.066
- Goldstone, J.V., McArthur, A.G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jönsson, M.E., Nelson, D.R., Stegeman, J.J., 2010. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. BMC Genomics. 11,643.
doi:10.1186/1471-2164-11-643
- Guo H., Bao, Z., Du, H., Zhang, L., Wang, S., Sun, L., Mou, X., Hu, X., 2013. Identification of Cytochrome P450 (*CYP*) Genes in Zhikong Scallop (*Chlamys farreri*). J. Ocean Univ. China. 12,97-102.
doi:10.1007/s11802-013-1967-5
- Guo, R, Pan, L., Lin, P., Zheng, L., 2016. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. Comp. Biochem. Physiol. C. 191,36-51.
doi:10.1016/j.cbpc.2016.09.004.
- Guo, W., He, M., Yang, Z., Lin, C., Quan, X., Wang, H., 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. Chemosphere. 68, 93-104.
doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.072
- Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M., 1992. Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of Besos and Llobregat rivers (Barcelona,

- Spain). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 23,19–25.
doi:10.1007/BF00225991
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. Chem. Biol. Interact. 141,131-60. doi:10.1016/S0009-2797(02)00070-4
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. J. Hazard. Mater. 169,1-15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45,51–88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- Higgins, L.G., Hayes, J.D., 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. Drug Metab. Rev. 43, 92–137. doi:10.3109/03602532.2011.567391
- Holth, T.F., Eidsvoll, D.P., Farmen, E., Sanders, M.B., Martínez-Gómez, C., Budzinski, H., Burgeot, T., Guilhermino, L., Hylland, K., 2014. Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquat. Toxicol. 154,240-252.
doi:10.1016/j.aquatox.2014.05.013
- Hu, F., Pan, L., Xiu, M., Jin, Q., Wang, G., Wang, C., 2015. Bioaccumulation and detoxification responses in the scallop *Chlamys farreri* exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA). Environ. Toxicol. Pharmacol. 39, 997–1007.
doi:10.1016/j.etap.2015.03.006.
- Ikenaka, Y., Eun, H., Ishizaka, M., Miyabara, Y., 2006. Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 80,158-165. doi:10.1016/j.aquatox.2006.08.005
- Ikenaka, Y., Oguria, M., Saengtienchaia, A., Nakayamaa, S.M.M., Ijirib, S., Ishizuka, M., 2013. Characterization of phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: Unique pyrene metabolism and species specificity observed in fish

species. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36,567–578.
doi:10.1016/j.etap.2013.05.018

Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 2000. Membrane-associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism (MAPEG). A Widespread Protein Superfamily. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161,S20–S24.
doi:10.1164/ajrccm.161.supplement_1.lta-5

Jenny, M.J., Walton, W.C., Payton, S.L., Powers, J.M., Findlay, R.H., O'Shields, B., Diggins, K., Pinkerton, M., Porter, D., Crane, D.M., Tapley, J., Cunningham, C., 2016. Transcriptomic evaluation of the American oyster, *Crassostrea virginica*, deployed during the Deepwater Horizon oil spill: Evidence of an active hydrocarbon response pathway. *Mar. Environ. Res.* 120,166-81. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.08.006

Jensen, M.H., Nielsen, T.G., Dahllöf, I., 2008. Effects of pyrene on grazing and reproduction of *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* from Disko Bay, West Greenland. *Aquat. Toxicol.* 87,99–107. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.005

Johansson, K., Järvliden, J., Gogvadze, V., & Morgenstern, R., 2010. Multiple roles of microsomal glutathione transferase 1 in cellular protection: a mechanistic study. *Free Radical Bio. Med.* 49,1638-1645. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.013

Kaushik, P., Haritash, A.K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health, *Our Earth* 3, v,3, p.1-7

Kelly, F.J., 2003. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup. Environ. Med.* 60,612-616.
doi:10.1136/oem.60.8.612

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.*, 251, 6183–6188.

Kelner, M.J., Bagnell, R.D., Montoya, M.A., Estes, L.A., Forsberg, L., Morgenstern, R., 2000. Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (MGST1) on chromosome 12p13.1-

13.2. Identification of the correct promoter region and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 275, 13000–13006.
doi:10.1074/jbc.275.17.13000

Kim, M., Ahn, I.Y., Cheon, J., Park, H., 2009. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 152, 207-213.
doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.028

Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* 60,71-80.
doi:10.1016/j.envint.2013.07.019

Kirischian, N., McArthur, A.G., Jesuthasan, C., Krattenmacher, B., Wilson, J.Y., 2011. Phylogenetic and functional analysis of the vertebrate Cytochrome P450 2 family. *J. Mol. Evol.* 72,56–71.
doi:10.1007/s00239-010-9402-7

Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A.D., 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 372,49-57.
doi:10.1016/j.jembe.2009.02.004

Krasnov, A., Koskinen, H., Rexroad, C., Afanasyev, S., MöLsä, H., Oikari, A., 2005. Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 74,70–81.
doi:10.1016/j.aquatox.2005.04.009

Latimer, J., Zheng, J., The sources, transport, and fate of PAH in the marine environment In: Douben, P.E.T., PAHs: An ecotoxicological perspective, John Wiley and Sons Ltd, New York, 2003, 404p.

Lazartigues, A., Thomas, M., Brun-Bellut, J., Feidt, C., 2010. Bioaccumulation of PAHs and their hydroxylated metabolites in common carp (*Cyprinus Carpio* Linnaeus 1758) in controlled

- environment. Polycycl. Aromat. Comp. 30,141-152, doi:10.1080/10406631003756187
- Lazoski, C., Gusmão, J., Boudry, P., Solé-Cava, A.M., 2011. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: Evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. Mar. Ecol. Prog. Ser. 426, 197–212. doi:10.3354/meps09035
- Lee, T.S., 2008. Reverse conservation analysis reveals the specificity determining residues of cytochrome P450 family 2 (CYP 2). Evol. Bioinform. 4,7–16.
- Li, J., Lu, S., Liu, G., Zhou, Y., Lv, Y., She, J., Fan, R., 2015. Co-exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene and toluene and their dose-effects on oxidative stress damage in kindergarten-aged children in Guangzhou, China. Sci. Total. Environ. 524-525,74-80. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.020
- Liu, N., Pan, L., Miao, J., Xu, C., Zhang, L., 2010. Molecular cloning and sequence analysis and the response of a aryl hydrocarbon receptor homologue gene in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo(a)pyrene. Comp. Biochem. Physiol. C. 152,279-187. doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.004
- Liu, D., Pan, L., Cai, Y., Li, Z., Miao, J., 2014a. Response of detoxification gene mRNA expression and selection of molecular biomarkers in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo [a] pyrene. Environ. Pollut. 189,1–8. doi:10.1016/j.envpol.2014.02.013
- Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y.F., Miao, J., 2014b. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 107, 251–259. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.024
- Liu, T., Pan, L., Jin, Q., Cai, Y., 2015. Differential gene expression analysis of benzo(a)pyrene toxicity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. Ecotoxicol. Environ. Safe. 115,126–136. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.02.007

- Lüchmann, K.H., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Daura-Jorge, F.G., Bainy, A.C.D., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquat. Toxicol.* 105, 652–660. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.003
- Lüchmann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan, R., Craft, J.A., Meng, X., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C., Bainy, A.C.D., 2014. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 152, 324–334. doi:10.1016/j.aquatox.2014.04.021
- Lüchmann, K.H., Clark, M.S., Bainy, A.C.D., Gilbert, J.A., Craft, J.A., Chipman, J.K., Thorne, M.A., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Schroeder, D.C., 2015. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. *Aquat. Toxicol.* 166, 10–20. doi:10.1016/j.aquatox.2015.06.012
- Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294,R1919-1929 doi:10.1152/ajpregu.00563.2007
- Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganeka, M., Neča, J., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res.* 497,49–62. doi:10.1016/S1383-5718(01)00240-6
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodrigues, T.B., Marques, M.R., Bainy, A.C.D., 2008. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 362–365. doi:10.1016/j.etap.2008.05.004
- Meier, S., Craig Morton, H., Nyhammer, G., Grøsvik, B.E., Makhotin, V., Geffen, A., Boitsov, S., Kvestad, K.A., Bohne-Kjersem, A., Goksøyr, A., Folkvord, A., Klungsøyr, J., Svardal, A., 2010. Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to

- produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. *Mar. Environ. Res.* 70,383-394, 2010. doi:10.1016/j.marenvres.2010.08.002
- Miller, M.M., Wasik, S.P., Huang, G.L., Shiu, W.Y., Mackay, D., 1985. Relationships between octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Environ. Sci. Technol.* 19,522-529. doi:10.1021/es00136a007
- Mitra, P., Audus, K.L., 2009. Expression and functional activities of selected sulfotransferase isoforms in BeWo cells and primary cytotrophoblast cells. *Biochem. Pharmacol.* 78,1475-1482. doi:10.1016/j.bcp.2009.07.013
- Monari, M., Foschi, J., Matozzo, V., Marin, M.G., Fabbri, M., Rosmini, R., Serrazanetti, G.P., 2009. Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and their role in response to B[a]P. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 149, 382-392. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.008
- Muangchinda, C., Yamazoe, A., Polrit, D., Thoetkiattikul, H., Mhuantong, W., Champreda, V., Pinyakong, O., 2017. Biodegradation of high concentrations of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous bacteria from a river sediment: a microcosm study and bacterial community analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24,4591-4602. doi:10.1007/s11356-016-8185-9
- Nagata, K., Yamazoe, Y., 2000. Pharmacogenetics of Sulfotransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40,159-76. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.159
- Nelson, D.R., 2009. The cytochrome P450 homepage. *Hum. Genomics.* 4,59-65. doi:10.1186/1479-7364-4-1-59
- Nelson, D.R., 2011. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814,14-18, doi:10.1016/j.bbapap.2010.08.008

- Nelson, D.R., Goldstone, J. V., Stegeman, J.J., 2013. The cytochrome P450 genesis locus the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 368. doi:10.1098/rstb.2012.0474
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecol. Ind.* 19,206-214. doi:10.1016/j.ecolind.2011.08.006
- Omicinski, C.J., Heuvel, J.P.V., Perdew, G.H., Peters, J.M., 2011. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* 120,S49-S75. doi:10.1093/toxsci/kfq338
- Opuene, K., Agbozu, I.E., Iwuozor, C.C., 2007. Identification of perylene in sediments: occurrence and diagenetic evolution. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 4,457-462. doi:10.1007/BF03325981
- Pessatti, T.B., Lüchmann, K.H., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Bainy, A.C.D., 2016. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. *Ecotox. Environ. Saf.* 31, 172-180. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.04.003
- Piazza, R.S., Trevisan, R., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Wendt, N., Mattos, J.J., Lima, D., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Mello, A.C.P., Zacchi, F.L., Serrano, M.A.S., Gomes, C.H.A.M., Bicego, M.C., Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., 2016. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. *Aquat. Toxicol.* 177, 146-155. doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.025
- Pie, M.R., Ribeiro, R.O., Boeger, W.A., Ostrensky, A., Falleiros, R.M., Angelo, L., 2006. 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. *Aquac. Res.* 37, 1598-1600. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01591.x

- Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman, R., 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*. 40,557-563. doi:10.1016/S0045-6535(99)00320-3
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54, 419–423. doi:10.1016/S0141-1136(02)00146-0
- Rewitz, K.F., Styriehave, B., Løbner-Olesen, A., Andersen, O., 2006. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 143,363–381. doi:10.1016/j.cbpc.2006.04.001
- Rodrigues-Silva, C., Flores-Nunes, F., Vernal, J.I., Cargnin-Ferreira, E., Bairy, A.C.D., 2015. Expression and immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isoform 356A1 (*CYP356A1*) in oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 159, 267–275. doi:10.1016/j.aquatox.2014.12.021
- Sangster, J., 1989. Octanol-water partition coefficients for simple organic compounds. *J. Phys. Chem.* 18,1111-1229. doi:10.1063/1.555833
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E., George, S., James, M., Kullman, S., Van Den Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in fishes. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 153–234. doi:10.1201/9780203647295.ch4
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Sereshk, Z.H., Bakhtiari, A.R., 2014. Distribution patterns of PAHs in different tissues of annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) and short sea snake (*Lapemis curtus*) from the Hara Protected Area on the North Coast of the Persian Gulf, Iran. *Ecotox. Environ. Safe.* 109,116–123. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.004

- Serrano, M.A.S., Gonzalez-Rey, M., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Mello, A.C.P., Zacchi, F.L., Piazza, C.E., Siebert, M.N., Piazza, R.S., Alvarez-Muñoz, D., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Bebianno, M.J., Gomes, C.H.A.M., Melo, C.M.R., Bainy, A.C.D., 2015. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-11. doi:10.1007/s11356-014-4023-0
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y., 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox. Signal.* 6,289–300, 2004. doi:10.1089/152308604322899350
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360,1-16. doi:10.1042/bj3600001
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutler, T.R., 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens P-450 1B1 by human cytochrome. *Cancer Res.* 56,2979–2984.
- Shimoji, M., Figueroa, R.A., Neve, E., Maksel, D., Imreh, G., Morgenstern, R., Halberg, E., 2017. Molecular basis for the dual subcellular distribution of microsomal glutathione transferase 1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859,238e244. doi:10.1016/j.bbamem.2016.11.014
- Shirdel, I., Kalbassi, M.R., Shokri, M., Olyaei, R., Sharifpour, I., 2016. The response of thyroid hormones, biochemical and enzymological biomarkers to pyrene exposure in common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox. Environ. Safe.* 130,207-213. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.023
- Siebert, M.N., Mattos, J.J., Piazza, C.E., Lima, D., Gomes, C.H.A.M., Melo, C.M.R, Bainy, A.C.D., 2017a. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster

- Crassostrea brasiliana*. Comp. Biochem. Physiol. B. 203,115-121. doi:0.1016/j.cbpb.2016.10.002
- Siebert, M.N., Mattos, J.J., Toledo-Silva, G., Razzera, G., Bainy, A.C.D., 2017b. Candidate *cytochrome P450* genes for ethoxyresorufin *O*-deethylase activity in oyster *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 189,142-149. doi:10.1016/j.aquatox.2017.06.004.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem. 269,8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59,201-222.
- Sinaei, M., 2013. Effect of 16 pure hydrocarbons on the stabilization and lysis of fish (mudskipper: *Boleophthalmus dussumieri*) erythrocytes. Ecotox. Environ. Safe. 98,257–265. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.07.018
- Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Goksoyr, A., 1988. Apparent cytochrome P-450 induction as an indication of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46,55-60. Doi:10.3354/meps046055
- Stephens, S.M., Frankling, S.C., Stagg, R.M., Anne Brown, J., 2000. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. Mar. Pollut. Bull. 40,928-937. doi:10.1016/S0025-326X(00)00031-X
- Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Cogliano V., 2005. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Lancet. Oncol., 6,931-932.
- Tan, Y.L., Kong, A., Monetti, M.A., 1996. Biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an Alaskan Arctic Lake sediment. Polycycl. Aromat. Comp. 9,185-192. doi:10.1080/10406639608031217
- Thomas, P., Wofford, H.W., Neff, J.M., 1981. Biochemical stress responses of striped mullet (*Mugil cephalus*) to fluorene analogs. Aquat. Toxicol. 1,329-342. doi:10.1016/0166-445X(81)90026-6

- Tian, S., Pan, L., Sun, X., 2013. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a]pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. *Aquat. Toxicol.* 144,162–171. doi:10.1016/j.aquatox.2013.09.031
- Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T.C., Moraes, M.O., Goldstone, J.V., Bainy, A.C.D., 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (*CYP356A1*) from oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 66, 15–18. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.010
- Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* 65, 1225–1237. doi:10.1124/mol.65.5.1225.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149, 2003. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Vondráček, J., Švihálková-Šindlerová, L., Pěničková, K., Marvanová, S., Krčmář, P., Ciganek, M., Neča, J., Trosko, J.E., Upham, B., Kozubík, A., Machala, M., 2007. Concentrations of methylated naphthalenes, anthracenes, and phenanthrenes occurring in Czech river sediments and their effects on toxic events associated with carcinogenesis in rat liver cell lines. *Environ. Toxicol. Chem.* 26,2308–2316. doi:10.1897/07-161R.1
- Wan, Q., Whang, I., Lee, J.S., Lee, J., 2009. Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 150,558–568. doi:10.1016/j.cbpc.2009.08.003
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.T., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30,347–570. doi:10.1080/10408440091159239

- Williams, D.E., Lech, J.J., Buhler, D.R., 1998. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 399,179–192. doi:10.1016/S0027-5107(97)00255-8
- Xie, J., Zhao, C., Han, Q., Zhou, H., Li, Q., Diao, X., 2017. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. *Fish. Shellfish. Immun.* 63,237-244. doi:10.1016/j.fsi.2017.02.032
- Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., Miao, J., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 170,50–59. doi:10.1016/j.cbpc.2015.02.003
- Yancheshmeh, R.A., Bakhtiari, A.R., Mortazavi, S., Savabieasfahani, M., 2014. Sediment PAH: contrasting levels in the Caspian Sea and Anzali Wetland. *Mar. Pollut. Bull.* 84,391-400. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.05.001
- Zacchi, F.L., Lima, D., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Gomes, C.H.A., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bainy, A.C.D. 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. *Aquat.Toxicol.* 183,94-103. doi:10.1016/j.aquatox.2016.12.016
- Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J.V., Parente, T., Woodin, B.R., Bainy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2013. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 128-129,101–112. doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.017.
- Zhang, G.; Fang, X.; Guo, X.; Li, L.; Luo, R.; Xu, F.; Yang, P.; Zhang, L.; Wang, X.; Qi, H.; Xiong, Z.; Que, H.; Xie, Y.; Holland, P. W.; Paps, J.; Zhu, Y.; Wu, F.; Chen, Y.; Wang, J.; Peng, C.; Meng, J.; Yang, L.; Liu, J.; Wen, B.; Zhang, N.; Huang, Z.; Zhu, Q.; Feng, Y.; Mount, A.; Hedgecock, D.; Xu, Z.; Liu, Y.; Domazet-Loaso, T.; Du, Y.; Sun, X.; Zhang, S.; Liu, B.; Cheng, P.; Jiang, X.; Li, J.; Fan, D.; Wang, W.; Fu, W.; Wang, T.; Wang, B.; Zhang, J.; Peng, Z.; Li, Y.; Li, N.; Chen, M.; He, Y.; Tan, F.; Song, X.; Zheng, Q.;

- Huang, R.; Yang, H.; Du, X.; Chen, L.; Yang, M.; Gaffney, P. M.; Wang, S.; Luo, L.; She, Z.; Ming, Y.; Huang, W.; Huang, B.; Zhang, Y.; Qu, T.; Ni, P.; Miao, G.; Wang, Q.; Steinberg, C. E.; Wang, H.; Qian, L.; Liu, X.; Yin, Y., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*. 490,49-54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, Z., Lv, Z., Shao, Y., Qiu, Q., Zhang, W., Duan, X., Li, Y., Li, C., 2017. Microsomal glutathione transferase 1 attenuated ROS-induced lipid peroxidation in *Apostichopus japonicas*. *Dev. Comp. Immunol.* 73,79-87. doi:10.1016/j.dci.2017.03.011.
- Zhu, S., King, S.C., Haasch, M., 2008. Biomarker induction in tropical fish species on the Northwest Shelf of Australia by produced formation water. *Mar. Environ. Res.* 65,315–324. doi:10.1016/j.marenvres.2007.11.007.
- Zou, Y., Wei, X.M., Weng, H.W., Li, H.Y., Liu, J.S., Yang, W.D., 2015. Expression profile of eight glutathione S-transferase genes in *Crassostrea ariakensis* after exposure to DSP toxins producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Toxicon.* 105,45-55. doi:10.1016/j.toxicon.2015.08.018

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A realização desse estudo demonstrou, no Capítulo 2, que os genes de biotransformação de fase I foram afetados principalmente pela exposição ao fenantreno e evidenciou os efeitos da salinidade sobre a transcrição de genes do sistema de biotransformação de fase II, do sistema antioxidante e do metabolismo de aminoácidos da ostra *Crassostrea brasiliana*. Ainda, os resultados de interação entre os fatores salinidade e fenantreno nos genes *CYP2-like2* e *SULT-like* sugerem que, em baixas salinidades, as ostras são mais susceptíveis aos efeitos do fenantreno em níveis transcricionais. O efeito da salinidade sobre os genes relacionados ao sistema antioxidante e metabolismo de aminoácidos sugere um importante papel desses genes na codificação de proteínas que envolvem proteção contra danos oxidativos e adaptações celulares à salinidade.

No Capítulo 3, foi analisada a resposta de genes e enzimas relacionados com o sistema de biotransformação de fase I e II de HPAs em ostras *C. brasiliana* expostas ao pireno e fluoreno. A maior lipofilicidade do pireno em relação ao fluoreno pode estar associada ao menor tempo de meia-vida desse HPA na água dos aquários com ostras, bem como à maior quantidade de respostas observadas nos níveis de transcritos e atividade enzimática em brânquias de *C. brasiliana*. Em todos os genes de biotransformação de fase I (*CYP1-like*; *CYP2-like*; *CYP2AU1* e *CYP356A1-like*) e fase II (*GST Ω -like*; *GSTM-like* e *SULT-like*) avaliados, houve aumento do nível de transcritos em ostras expostas ao pireno. Somados a esses resultados, houve aumento da atividade EROD e GSTm. Esses resultados evidenciam a atuação do metabolismo de biotransformação do pireno em *C. brasiliana* nas condições testadas. Após exposição ao fluoreno, apenas houve aumento dos níveis de transcritos no gene *CYP2AU1*.

Fundamentado em uma análise geral, o gene *CYP2AU1* apresentou variações transcricionais após exposição ao fenantreno, pireno e fluoreno. Esses resultados, somados a estudos anteriores realizados em nosso laboratório com *C. brasiliana* em diferentes condições de exposição, sugerem o uso do gene *CYP2AU1* como potencial biomarcador molecular em ostras *C. brasiliana* expostas a HPAs.

Com a finalidade de observação dos perfis de resposta ao longo do tempo, em todos os experimentos realizados, as respostas bioquímicas e moleculares foram avaliadas em *C. brasiliana* nos mesmos períodos de exposição (24 h e 96 h). Após exposição à salinidade e fenantreno, houve

respostas dos genes avaliados tanto em 24 h, quanto em 96 h. Situações crônicas de estresse, como o estresse osmótico, podem ocasionar oscilações nos níveis de transcrição gênica ao longo do tempo, levando à variação das respostas moleculares. Em função disso, no primeiro experimento, não foi possível traçar um perfil de resposta molecular relacionado ao tempo. Após exposição ao fluoreno, somente foi observada alguma alteração em nível molecular nos parâmetros estudados em 96 h. No entanto, após 24 h de exposição ao pireno, foram observadas respostas moleculares em todos os genes avaliados. As respostas bioquímicas, por sua vez, foram observadas em 96 h de exposição ao pireno. Estes perfis podem auxiliar na escolha dos tempos de exposição ao pireno e fluoreno em experimentos futuros. É importante ressaltar que, no presente estudo, apenas genes e enzimas relacionados ao sistema de biotransformação foram analisados, e faz-se necessária a realização de estudos que envolvam outras vias e processos metabólicos.

Fatores abióticos, como a salinidade, devem ser levados em consideração na realização de estudos com biomarcadores moleculares de contaminação por HPAs em *C. brasiliensis*. Genes comumente utilizados nesses estudos com biomarcadores, como por exemplo, aqueles relacionados com o sistema de defesas antioxidantes (*CAT-like* e *SOD-like*), após exposição ao fenantreno e salinidade no presente estudo, foram afetados somente pela salinidade. Corroborando esta conclusão, os níveis de transcritos de genes de biotransformação de fase II *GST Ω -like* e *GSTm-like*, mesmo alterados após exposição ao pireno, foram influenciados apenas pela salinidade, após exposição ao fenantreno e salinidade.

Diante destas considerações, é importante destacar a necessidade de realização de mais estudos que reforcem os resultados desta tese. Devem ser levados em conta, além dos HPAs e salinidade, outros fatores abióticos como a temperatura e o pH, com a finalidade de compreender como esses fatores podem vir a interferir nas respostas moleculares de ostras *C. brasiliensis*. Além disso, para efeito de estudos que envolvam biomarcadores de contaminação aquática, é oportuno frisar a necessidade da avaliação de respostas moleculares e bioquímicas em outras vias e processos metabólicos, bem como em outros tecidos de *C. brasiliensis*, frente à exposição a HPAs, concentrações e tempos de exposição diferentes dos avaliados nesta tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDEL-SHAFY, H.I.; MANSOUR, M.S.M., A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v.25, p.107-123, 2016.

ABSHER, T.M.; CHRISTO, S.W., Índices de condição de ostras da região entre-marés da Baía de Paranaguá, Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.36, n.2, p.253-261, 1993.

ALCÁNTARA, M.T.; GÓMEZ, J.; PAZOS, M.; SANROMÁN, M.A., PAHs soil decontamination in two steps: Desorption and electrochemical treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v.166, n.1, p.462-468, 2009.

ALEGBELEYE, O.O.; OPEOLU, B.O.; JACKSON, V. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.48, p.314-325, 2017.

ALMEIDA, Â.; CALISTO, V.; DOMINGUES, M.R.M.; ESTEVES, V.I.; SCHNEIDER, R.J.; SOARES, A.M.V.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Comparison of the toxicological impacts of carbamazepine and a mixture of its photodegradation products in *Scrobicularia plana*. **Journal of Hazardous Materials**, v.323A, p.220-232, 2017a.

ALMEIDA, Â.; CALISTO, V.; ESTEVES, V.I.; SCHNEIDER, R.J.; SOARES, A.M.V.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Toxicity associated to uptake and depuration of carbamazepine in the clam *Scrobicularia plana* under a chronic exposure. **Science of The Total Environment**, v.580, p.1129-1145, 2017b.

ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D.; LOUREIRO, A.P.M.; MARTINEZ, G.R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J., Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, v.146, p.588-600, 2007.

AMARAL, V.S.; SIMONE, L.R., Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.94, n.4, p.811-836, 2014.

AMBROSONE, C.B.; TANG, L. Cruciferous vegetable intake and cancer prevention: role of nutrigenetics. **Cancer Prevention Research**, v.2, n.4, p.298-300, 2009.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, n.2, p.158-170, 2003.

AN, M.I., CHOI, C.Y., Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.155, 34-42, 2010.

AKBERALI, H.B.; MARRIOTT, K.R.M.; TRUEMAN, E.R., Calcium utilisation during anaerobiosis induced by osmotic shock in a bivalve mollusc. **Nature**, v.266, p.852-853, 1977.

ARMSTRONG, B.; HUTCHINSON, E.; UNWIN, J.; FLETCHER, T., Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v.112, n.9, p.970-978, 2004.

BACHÈRE, E.; BARRANGER, A.; BRUNO, R.; ROUXEL, J.; MENARD, D.; PIQUEMAL, D.; AKCHA, F. Parental diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.142, p.51-58, 2017.

BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MÜLLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D., Biochemical responses in farmed mussel *Perna*

perna transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p.411-416, 2000.

BALDEZ, R.S.C.; MELO, M.A.D.; SAMPAIO, I.; TAGLIARO, C.H., Novel microsatellite markers for Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) and their cross-amplification in *Crassostrea rhizophorae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.59, p.1-5, 2016.

BARRON, M.G.; CARLS, M.G.; HEINTZ, R.; RICE, S.D. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. **Toxicological Sciences**, v.78, n.1, p.60-67, 2004.

BEACH, D.G.; QUILLIAM, M.A.; ROULEAU, C.; CROLL, R.P.; HELLOU, J. Bioaccumulation and biotransformation of pyrene and 1-hydroxypyrene by the marine whelk *Buccinum undatum*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, p.779-788, 2010.

BEBIANNI, M.J.; BARREIRA, L.A., Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussates* transplanted in the Ria Formosa lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1849-1860, 2009.

BERGER, V.J.; KHARAZOVA, A.D., Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. **Hydrobiologia**, v.355, p.115-126, 1997.

BERNARDO, D.L.; BARROS, K.A.; SILVA, R.C.; PAVÃO, A.C. Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Química Nova**, v.39, n.7, p.789-794, 2016.

BERTRAND, C.; DEVIN, S.; MOUNEYRAC, C.; GIAMBÉRINI, L., Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. **Ecological Indicators**, v.74, p.334-342, 2017.

BEYER, J. J.; G., PORTE, C.; KRAHN, M.M.; ARIESE, F., Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic

hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.30, p.224-244, 2010.

BIANCHINI, A.; LAUER, M.M.; NERY, L.E.M.; COLARES, E.P.; MONSERRAT, J.M.; FILHO, E.A.S., Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.151, p.423-436, 2008.

BISHOP, S.H.; GREENWALT, D.E.; BURCHAM, J.M., Amino acid cycling in ribbed mussel tissues subjected to hyperosmotic shock. **Journal of Experimental Zoology**, v.215, p.277-287, 1981.

BISHOP, S.H.; GREENWALT, D.E.; KAPPER, M.A.; PAYNTER, K.T.; ELLIS, L.L., Metabolic regulation of proline, glycine, and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. **Journal of Experimental Zoology**, v.268, p.151-161, 1994.

BOSTRÖM, C.E.; GERDE, P.; HANBERG, A.; JERNSTRÖM, B.; JOHANSSON, C.; KYRKLUND, T.; RANNUG, A.; TÖRNQVIST, M.; VICTORIN, K.; WESTERHOLM, R., Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the ambient air. **Environmental Health Perspectives**, v.110, p.451-488, 2002.

BUSSELL, J.A.; GIDMAN, E.A.; CAUSTON, D.R.; GWYNN-JONES, D.; MALHAM, S.K.; JONES, M.L.M.; REYNOLDS, B.; SEED, R., Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. **Ecology**, v.358, n.1., p.78-85, 2008.

BRASIL., Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**, Brasília: MPA, 2013. 60p.

BRUYN, W.J.; CLARK, C.D.; OTTELLE, K.; AIONA, P. Photochemical degradation of phenanthrene as a function of natural water variables modeling freshwater to marine environments. **Marine Pollution Bulletin**, v.64, p.532-538, 2012.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of The Total Environment**, v.247, p.295-311, 2000.

CARREGOSA, V.; FIGUEIRA, E.; GIL, A.M.; PEREIRA, S.; PINTO, J.; SOARES, A.M.V.M.; FREITAS, R., Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.171, p.36-43, 2014a.

CARREGOSA, V.; VELEZ, C.; SOARES, A.M.V.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R., Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.177-178, p.1-9, 2014b.

CASELLAS, M.; FERNANDEZ, P.; BAYONA, J. M.; SOLANAS, A.M. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). **Chemosphere**, v.30, p.725-740, 1995.

CASELLAS, M.; GRIFOLL, M.; BAYONA, J.M.; SOLANAS, A.M. New Metabolites in the Degradation of Fluorene by *Arthrobacter sp.* Strain F101. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.3, p.819-826, 1997.

CHALER, R.; CANTÓN, L.; VAQUERO, M.; GRIMALT, J.O., Identification and quantification of n-octyl esters of alkanolic and hexanedioic acids and phthalates as urban wastewater markers in biota and sediments from estuarine areas. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 203-210, 2004.

CHENG, W.; JUANG, F.M.; CHEN, J.C., The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. **Fish and Shellfish Immunology**, v.16, n.3, p.295-306, 2004.

CHU, F.L.E.; LA PEYRE, J.F.; BURRESON, C.S., *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity effects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.3, p.226-232, 1993.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y., Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, p.749-62, 2010.

COCCI, P.; CAPRIOTTI, M.; MOSCONI, G.; PALERMO, F.A. Transcriptional variations in biomarkers of *Mytilus galloprovincialis* sampled from Central Adriatic coastal waters (Marche region, Italy). **Biomarkers**, v.19, p.1-11, 2017.

CONAMA, 2005. Resolução n.357 de 11 de março de 2005. Dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'águas e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi1/4459>. Acesso em: Fevereiro, 2017.

CONAMA, 2012. Resolução n.454 de 01 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi1/4459>. Acesso em: Fevereiro, 2017.

CONNELL, D.W., **Bioaccumulation of Xenobiotic Compounds**. CRC Press, Boca Raton, Flórida. 219p. 1990.

DAHLE, S.; SAVINOV, V.M.; MATISHOV, G.G.; EVENSET, A.; NAES, K., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bottom sediments of the Kara Sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay. **Science of the Total Environment**, v.306, p.57-71, 2003.

DAMÁSIO, J.; BARCELÓ, D.; BRIX, R.; POSTIGO, C.; GROS, M.; PETROVIC, M.; SABATER, H.; GUASCH, H.; ALDA, M.L.; BARATA, C., Are pharmaceuticals more harmful than other pollutants to aquatic invertebrate species? A hypothesis tested using multi-

biomarker and multi-species responses in field collected and transplanted organisms. **Chemosphere**, v.85, p.1548-1554, 2011.

DAVENPORT, J., The opening response of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to rising sea-water concentration. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.61, p.667-678, 1981.

DEPLEDGE, M.H.; FOSSI, M.C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v.3, p.161-172, 1994.

DE ZOYSA, M.; WHANG, I.; LEE, Y.; LEE, S.; LEE, J.S.; LEE, J., Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.154, n.4, p.387-395, 2009.

DISSANAYAKE, A.; BAMBER, S.D., Monitoring PAH contamination in the field (South west Iberian Peninsula): biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). **Marine Environmental Research**, v.70, p.65-72, 2010.

ELLIOT, M.; MCLUSKY, D.S., The need for definitions in understanding estuaries. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.55, p.815-827, 2002.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category**, EPA 260-B-01-03, Washington, DC, 2008.

EU, European Union. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) factsheet. Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements JRC 66955**, 4thed, 27p., 2011.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P., The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v.85, p.97-177, 2005.

FAO Food and Agriculture Organization. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2012**. Rome. 223p. 2014.

FAO Food and Agriculture Organization. International Fund for Agricultural Development, World Food Program. 2015. **The State of Food Insecurity in the World 2015. Strengthening the enabling environment for food security and nutrition**. Rome. 56 p. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a4ef2d16-70a7-460a-a9ac-2a65a533269a/i4646e.pdf> Acesso em: Dezembro, 2016.

FAO Food and Agriculture Organization. 2016. **2014 Yearbook – Fisheries and Aquaculture Statistics**. Rome. 76p. 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5716t.pdf> Acesso em: Janeiro, 2017.

FERNANDES, M.B.; SICRE, M.A.; BOIREAU, A.; TRONCZYNSKI, J., Aquatic hydrocarbon distributions in the Seine estuary: biogenic polyaromatics and n-alkanes. **Estuaries**, v.20, p.281-290, 1997.

FERNANDEZ, P.; GRIFOLL, M.; SOLANAS, A.M.; BAYONA, J.M.; ALBAIGÉS, J. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal marine sediments. **Environmental Science and Technology**, v.26, p.817-829, 1992.

FERREIRA, J.F., NETO, F.M.O., Cultivo de moluscos em Santa Catarina. Em: Barroso, G.F., Poersch, H. da S., Cavalli, R.O., **Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: Recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócio-econômicos**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, v.1, p.87-95, 2007.

FERREIRA, J.F.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; FERREIRA, F.M., Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.192-197, 2011.

FINGER, S.E.; LITTLE, E.F.; HENRY, M.G.; FAIRCHILD, J.F.; BOYLE, T.P. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorence - Part I: Effects of Fluorence on the Survival, Growth,

Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests. **ASTM International**, 1985.

FITILIS, I.; FAKIS, M.; POLYZOS, I.; GIANNETAS, V.; PERSEPHONIS, P.; VELLIS, P.; MIKROYANNIDIS, J. A two-photon absorption study of fluorene and carbazole derivatives. The role of the central core and the solvent polarity. **Chemical Physics Letters**, v.447, p.300-304, 2007.

FUNO, I.C.S.A.; ANTONIO, I.G.; MARINHO, Y.F.; GÁLVEZ, A.O., Influência da salinidade sobre a sobrevivência e crescimento de *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, n.4, p.837-847, 2015.

GAGNAIRE, B.; FROUIN, H.; MOREAU, K.; THOMAS-GUYON, H.; RENAULT, T., Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, n.4, p.536-547, 2006.

GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; PIMENTEL, C.M.M.; HENRIQUES, M.B., Performance of juvenile culture of the mangrove oyster *Crassostrea sp.* in suspended lanterns in subtidal zone of the Cananéia estuary and Itaguá Bay, Ubatuba. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo. v.35, p.401-411, 2009.

GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; HILSDORF, A.W.S., Molecular identification and distribution of mangrove oysters (*Crassostrea*) in an estuarine ecosystem in Southeast Brazil: implications for aquaculture and fisheries management. **Aquaculture Research**, v.44, p.1589-1601, 2012.

GERAUDIE, P.; BAKKEMO, R.; MILINKOVITCH, T.; THOMAS-GUYON, H. First evidence of marine diesel effects on biomarker responses in the Icelandic scallops, *Chlamys islandica*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.16, p. 16504–16512, 2016.

GOMES, C.H.A.M.; SILVA, F.C.; LOPES, G.R.; MELO, C.M.R, The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.4, p.967-976, 2014.

GOSLIN, E. **Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture**. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 456p. 2004.

GREEN, T.J.; BARNES, A.C., Reduced salinity, but not estuarine acidification, is a cause of immune-suppression in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. **Marine Ecology Progress Series**, v.402, p.161-170, 2010.

GRIFOLL, M.; SOLANAS, A.M.; BAYONA, J.M. Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of Besos and Llobregat rivers (Barcelona, Spain). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.23, p.19–25, 1992.

GRINTZALIS, K.; GEORGIU, C.D.; DAILIANIS, S.; Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. **Marine Environmental Research**, v.81, p.26–34, 2012.

GUEGUEN, Y.; DENIS, S.; ADRIEN, S.; KEVIN, M.; PIERRE, G.; SOLÈNE, B.; MARINE, N.; PATRICK, B.; HEREDIA, H.; SERGE, P.; GILLES, L.M. Response of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* to cadmium and chromium: Identification of molecular biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v.118, p.420-426, 2017.

GUIMARÃES, I.M.; ANTONIO, I.C.; PEIXOTO, S.; OLIVEIRA, A., Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae*. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.41, n.1, p.118-122, 2008.

GUO, W.; HE, M.; YANG, Z.; LIN, C.; QUAN, X.; WANG, H. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. **Chemosphere**, v.68, n.1, p.93-104. 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press, Nova York. 540p. 2007.

HAN, Z.X.; WANG, J.H.; LV, W.Z.; MIN, L. Multibiomarker approaches in common carp to assess the effects of phenanthrene.

Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, v.40, p.257-265. 2010.

HANNAM, M.L.; BAMBER, S.D.; GALLOWAY, T.S.; MOODY, A.J.; JONES, M.B. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v.78, n.7, p.779-784, 2009.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P., Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v.169, p.1-15, 2009.

HENRIQUES, M.B.; MACHADO, I.C.; FERNANDES, L., Comparative economic analysis of full culture and fattening systems of mangrove oysters *Crassostrea spp.* at Cananéia estuary, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, p.307-316, 2010.

HOSOI, M.; SHINZATO, C.; TAKAGI, M.; HOSOI-TANABE, S.; SAWADA, H.; TERASAWA, E.; TOYOHARA, H., Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expression in response to hyper-and hypo-osmotic stress. **Fisheries Science**, v.73, p.385-394, 2007.

HU F.; PAN, L.; XIU, M.; LIU, D. Dietary accumulation of tetrabromobisphenol A and its effects on the scallop *Chlamys farreri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.167, p.7-14, 2015a.

HU, F.; PAN, L.; XIU, M.; JIN, Q. Exposure of *Chlamys farreri* to tetrabromobisphenol A: accumulation and multibiomarker responses. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.16, p. 12224–12234, 2015b.

Iavicoli, I.; LESO, V.; SCHULTE, P.A. Biomarkers of susceptibility: State of the art and implications for occupational exposure to engineered nanomaterials. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.299, p.112-124, 2016.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007: grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília. 151p. 2007

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2015**. Rio de Janeiro, 2015, v.45, p.1-49.

IGNACIO, B.L.; ABSHER, T.M.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A.M., Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v.136, p.987-991, 2000.

INCARDONA, J.P.; COLLIER, T.K.; SCHOLZ, N.L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.196, n.2, p.191-205, 2004.

JENSEN, M.H.; NIELSEN, T.G.; DAHLLÖF, I. Effects of pyrene on grazing and reproduction of *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* from Disko Bay, West Greenland. **Aquatic Toxicology**, v.87, p.99–107, 2008.

KAUSHIK, P.; HARITASH, A.K., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health, **Our Earth** 3, v,3, p.1-7, 2006.

KELLY, F.J. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. **Occupational and Environmental Medicine**, v.60, p.612-616, 2003.

KERR, J.M.; MELTON, H.R.; MCMILLEN, S.J.; MAGAW, R.I.; NAUGHTON, G. Polyaromatic hydrocarbon content in crude oils around the world. SPE 52724. **SPE/EPA Exploration and Production Environmental Conference**, Austin, USA: Society of Petroleum Engineers. 10 p. 1999.

KIM, M.; AHN, I.Y.; CHEON, J.; PARK, H. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.152, p.207-213, 2009.

KIM, K.H.; JAHAN, S.A.; KABIR, E.; BROWN, R.J.C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, v.60, p.71-80, 2013.

KRASNOV, A.; KOSKINEN, H.; REXROAD, C.; AFANASYEV, S.; MÖLSÄ, H.; OIKARI, A. Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v.74, n.1, p.70–81, 2005.

KUCHEL, R.P.; RAFTOS, D.A.; NAIR, S., Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.29, p.930-93, 2010.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean and Coastal Management**, v.52, p.348-354, 2009.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEUERTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P., Trans-Atlantic distribution of mangrove oyster species revealed by *16S* mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v.202, p.232-242, 2002.

LATIMER, J.; ZHENG, J., The sources, transport, and fate of PAH in the marine environment Em: Douben, P.E.T., **PAHs: An ecotoxicological perspective**, John Wiley and Sons Ltd, New York. 404p. 2003.

LAZARTIGUES, A.; THOMAS, M.; BRUN-BELLUT, J.; FEIDT, C., Bioaccumulation of PAHs and their hydroxylated metabolites in common carp (*Cyprinus Carpio* Linnaeus 1758) in controlled environment. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v.30, p.141-152, 2010.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A.M., Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v.426, p.197-212, 2011.

LEGAT, J.F.A. **Reprodução e cultivo da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) nos estados do Maranhão e Santa Catarina.** Tese (Doutorado em Aquicultura), Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 120p. 2015.

LEONARD, E.M.; BARCAROLLI, I.; SILVA, K.R.; WASIELESKY, W.; WOOD, C.M.; BIANCHINI, A., The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirolana armata*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.154, p.409-419, 2011.

LESSER, M., Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annual Review of Physiology**, v.68, p.253-278, 2006.

LI, J.; LU, S.; LIU, G.; ZHOU, Y.; LV, Y.; SHE, J.; FAN, R., Co-exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene and toluene and their dose-effects on oxidative stress damage in kindergarten-aged children in Guangzhou, China. **Science of the Total Environment**, v.524-525, p.74-80, 2015.

LIN, C.H.; YEH, P.L.; LEE, T.H., Ionic and amino acid regulation in hard clam (*Meretrix lusoria*) in response to salinity challenges. **Frontiers in Physiology**, v.69, p.395-400, 2016.

LIU, K.; DUAN, F.; HE, K.; MA, Y.; CHENG, Y., Investigation on sampling artifacts of particle associated PAHs using ozone denuder systems. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v.8, n.2, p.284-292, 2014.

LIU, X.; ZHANG, L.; YOU, L.; YU, J.; CONG, M.; WANG, Q.; LI, F.; LI, L.; ZHAO, J.; LI, C.; WU, H., Assessment of clam *Ruditapes philippinarum* as heavy metal bioindicators using NMR based metabolomics. **Soil Air Water**, v.39, n.8, p.759-766, 2011.

LIU, Y.; CHEN, L.; HUANG, Q.H.; LI, W.Y.; TANG, Y.J.; ZHAO, J.F. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in

surface sediments of the Huangpu River, Shanghai, China. **Science of the Total Environment**, v.407, n.8, p.2931–2938, 2009.

LIVINGSTONE, D.R., The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.120, p.43-49, 1998.

LOTZ, A.; PESCH, B.; DETTBARN, G.; RAULF, M.; WELGE, P.; RIHS, H.P.; BREUER, D.; GABRIEL, S.; HAHN, J.U.; BRÜNING, T.; SEIDEL, A. Metabolites of the PAH diol epoxide pathway and other urinary biomarkers of phenanthrene and pyrene in workers with and without exposure to bitumen fumes. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v.89, p.1251-1267, 2016.

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

LÜCHMANN, K.H.; MATTOS, J.J.; SIEBERT, M.N.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T.S.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S.T.; DAURA-JORGE, F.G.; BAINY, A.C.D., Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea gasar* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v.105, p.652-660, 2011.

LÜCHMANN, K.H.; MATTOS, J.J.; SIEBERT, M.N.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T.S.; TOLEDO-SILVA, G.; STOCO, P.H.; GRISARD, E.C.; BAINY, A.C.D., Supressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed to a diesel fuel water-accommodated fraction. **Setac press**, v.31, n.6, p.1249-1253, 2012.

LÜCHMANN, K.H.; CLARK, M.S.; BAINY, A.C.D.; GILBERT, J.A.; CRAFT, J.A.; CHIPMAN, J.K.; THORNE, M.A.S.; MATTOS, J.J.; SIEBERT, M.N.; SCHROEDER, D.C., Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress response revealed

by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana*. **Aquatic Toxicology**, v.166, p.10-20, 2015.

LUCKENBACH, T.; EPEL, D. ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.294, p.R1919-1929, 2008.

LUO, X.J.; CHEN, S.J.; MAI, B.X.; YANG, Q.S.; SHENG, G.Y.; FU, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. **Environmental Pollution**, v.139, p.9-20, 2006.

MACHADO, A.A.; HOFF, M.L.; KLEIN, R.D.; CORDEIRO, G.J.; LENCINA AVILA, J.M.; COSTA, P.G.; BIANCHINI, A., Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Marine Environmental Research**, v.98, p.96-105, 2014.

MARISA, I.; MATOZZO, V.; MUNARI, M.; BINELLI, A.; PAROLINI, M.; MARTUCCI, A.; FRANCESCHINIS, E.; BRIANESE, N.; MARIN, M.G. In vivo exposure of the marine clam *Ruditapes philippinarum* to zinc oxide nanoparticles: responses in gills, digestive gland and haemolymph. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.15, p.15275-15293, 2016.

MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.E. **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 457p. 1990.

MCLUSKY, D.S.; ELLIOTT, M. **The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management**. 3. Ed. University Press, Oxford, UK. 213p. 2004.

MELO, A.G.C.; VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P.M.; REECE, K.S.; TAGLIARO, C.H., Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.3, p.564-57, 2010a.

MELO, C.M.R.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C., *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. **Biological Invasions**, v.12, p.441-449, 2010b.

MELO, M.A.D.; da SILVA, A.R.B.; BEASLEY, C.R.; TAGLIARO, C.H., Multiplex species-specific PCR identification of native and non-native oysters (*Crassostrea*) in Brazil: a useful tool for application in oyster culture and stock management. **Aquaculture International**, v.21, p.1325-1332, 2013.

MENG, J.; ZHU, Q.; ZHANG, L.; LI, C.; LI, L.; SHE, Z.; HUANG, B.; ZHANG, G., Genome and transcriptome analyses provide insight into the eurihaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*. **PLoS One**, v.8, n.3, e58563, 2013.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; MOCHAYEDI, S.; KEVEKORDES, S. 1992. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v.278, p.1-9, 1992.

MOHAMED, B.; JEAN-YVES, M.; PIERRE, M.; HÉLÈNE, B.; ALEYA, L.; ELSA, B.; FLORENCE, G. Assessment of *Lemna minor* (duckweed) and *Corbicula fluminea* (freshwater clam) as potential indicators of contaminated aquatic ecosystems: responses to presence of psychoactive drug mixtures. **Environmental Science and Pollution Research**, p.1-13, 2017.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1476-1483, 2001.

MUANGCHINDA, C.; YAMAZOE, A.; POLRIT, D.; THOETKIATTIKUL, H.; MHUANTONG, W.; CHAMPREDA, V.; PINYAKONG, O. Biodegradation of high concentrations of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous bacteria from a river sediment: a microcosm study and bacterial community analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.5, p. 4591-4602, 2017.

MÜLLER, G.D.; LIMA, D.; ZACCHI, F.L.; PIAZZA, R.S.; LÜCHMANN, K.H.; MATTOS, J.J.; SCHLENK, D.; BAINY, A.C.D., Analysis of transcriptional responses of normalizing genes on *Crassostrea brasiliana* under different experimental conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2017.

NASCIMENTO, I.A., *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *Crassostrea brasiliana* (Lamarck) in South and America Central. Em: Menzel, W. (ed) **Estuarine and marine bivalve mollusk culture**. CRC Press, Boca Raton. p.125-134. 1991.

NETO, R.M.; ZENI, T.O.; LUDWIG, S.; HORODESKY, A.; GIROTTO, M.V.F.; CASTILHO-WESTPHAL, G.G.; OSTRENSKY, A., Influence of environmental variables on the growth and reproductive cycle of *Crassostrea* (Mollusca, Bivalvia) in Guaratuba Bay, Brazil. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**, v.57, n.3, p.208-218, 2013.

NEWMANN, B.; VAFEIDIS, A.T.; ZIMMERMANN, J.; NICHOLLS, R.J., Future coastal population growth and exposure to sea-level rise and coastal flooding – A global assessment. **PLoS One**, v.10, n.3, p.1-34, 2015.

NING, D.; WANG, H.; DING, C.; LU, H., Novel evidence of cytochrome P450- catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. **Biodegradation**, v.21, p.889–901, 2010.

NOH, S.R.; CHEONG, H.-K.; HA, M.; EOM, S.-Y.; KIM, H.; CHOI, Y.-H.; PAEK, D. Oxidative stress biomarkers in long-term participants in clean-up work after the Hebei Spirit oil spill. **Science of the Total Environment**, v.15, n.515-1516, p.207–214, 2015.

NORDBERG, G.F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. **Toxicology Letters**, v.192, p.45-49, 2010.

OLIVEIRA, M.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae):

mortality, biomarkers and swimming performance. **Ecological Indicators**, v.19, p.206-214, 2012.

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. **Chemosphere**, v.66, n.7, p.1284-1291, 2007.

OLIVEIRA, P.; ALMEIDA, Â.; CALISTO, V.; ESTEVES, V.I.; SCHNEIDER, R.J.; WRONA, F.J.; SOARES, A.M.V.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. **Water Research**, v.117, p.102-114, 2017.

OMIECINSKI, C.J.; HEUVEL, J.P.V.; PERDEW, G.H.; PETERS, J.M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Science**, v.120, p.S49-S75, 2011.

OPUENE, K.; AGBOZU, I.E.; IWUOZOR, C.C., Identification of perylene in sediments: occurrence and diagenetic evolution. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.4, p.457-462, 2007.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, p.276, 2008.

PALOLUOGLU, C.; BAYRAKTAR, H.; TURALIOGU, F.S.; BERBERLER, E. Wet deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Acenaphthylene, Fluorene ve Phenanthrene's in Erzurum city atmosphere. **Journal of Selcuk University Natural and Applied Science**, p.619-627, 2013.

PIAZZA, R.S.; TREVISAN, R.; FLORES-NUNES, F.; TOLEDO-SILVA, G.; WENDT, N.; MATTOS, J.J.; LIMA, D.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S.T.; MELLO, A.C.P.; ZACCHI, F.L.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, C.H.A.M.; BÍCEGO, M.C.; ALMEIDA, E.A.; BAINY, A.C.D. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of

scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, v.117, p.146-155, 2016.

PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO, L., 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. **Aquaculture Research**, v.37, p.1598-1600, 2006.

PIERCE, S.K.; ROWLAND-FAUX, L.M.; O'BRIEN, S.M.; Different salinity tolerance mechanisms in Atlantic and Chesapeake Bay conspecific oysters: glycine betaine and amino acid pool variations. **Marine Biology**, v.113, p.107-115, 1992.

PILLAY, T.V.R.; KUTTY, M.N. **Aquaculture: Principles and Practices**. 2. ed. Wiley-blackwell, Oxford, UK. 640p. 2005.

PNSB - Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008. Rio de Janeiro: **IBGE**. 222p. 2010.

PRB Population Reference Bureau. **2015 World Population Data Sheet**. Washington. 23p. 2016. Disponível em: http://www.prb.org/pdf15/2015-world-population-data-sheet_eng.pdf
Acesso em: Dezembro, 2016.

PROENÇA, C.E.M. Plataforma do agronegócio da malacologia. **CNPq, DPA/ MAPA**. Brasília. 76p. 2001.

PUCHNICK-LEGAT, A. **Anestesia e hibridação experimental em laboratório de espécies do gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae)**. Tese (Doutorado em Aquicultura), Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 112p. 2015.

RAMACHANDRAN, S.D.; SWEEZEY, M.J.; HODSON, P.V.; BOUDREAU, M.; COURTENAY, S.C.; LEE, K.; KING, T.; DIXON, J.A., Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. **Marine Pollution Bulletin**, v.52, p.1182-1189, 2006.

RAMDINE, G.; FICHET, D.; LOUIS, M., LEMOINE, S., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.79, p.80-89, 2012.

RAVELET, C.; KRIVOBOK, S.; SAGE, L.; STEIMAN, R. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. **Chemosphere**, v.40, p.557-563, 2000.

REID, H.I.; SOUDANT, P.; LAMBERT, C.; PAILLARD, C.; BIRKBECK, H., Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.56, p.249-258, 2003.

RICE, M.A.; WALLIS, K.; STEPHENS, G.C., Influx and net flux of amino acids into larval and juvenile European flat oysters, *Ostrea edulis* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.48, n.1, p.51-59, 1980.

RICHARDSON, B. J.; MAK, E.; LUCA-ABBOTT, S. B. D.; MARTIN, M.; MCCLELLAN, K.; LAM, P. K. S., Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p.503-514, 2008.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 2nd ed. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. 492 p. 1994,

ROBERTSON, L.S.; GALBRAITH, H.S.; IWANOWICZ, D.; BLAKESLEE, C.J.; CORNMAN, R.S. RNA sequencing analysis of transcriptional change in the freshwater mussel *Elliptio complanata* after environmentally relevant sodium chloride exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2017.

SAENZ, L. A.; SEIBERT, E. L.; ZANETTE, J.; FIELDER, H. D.; CURTIUS, A. J.; FERREIRA, J. F.; ALMEIDA, E. A.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D., Biochemical biomarkers and metals in *Perna*

perna mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v.73, p.796-804, 2010.

SALVI, D.; MACALI, A.; MARIOTTINI, P. Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family Ostreidae based on rRNA sequence-structure models and multilocus species tree. **PLoS One**, v.9, n.9., e108696, 2014.

SANTA CATARINA, Secretaria do Estado da Agricultura e da Pesca, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese informativa da maricultura, 2014**. Florianópolis. 8p. 2015. Disponível em: http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese_informativa_da_maricultura_2014.pdf Acesso em: Janeiro, 2017.

SARÀ, G.; ROMANO, C.; WIDDOWS, J.; STAFF, F.J., Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis* - Mollusca: Bivalvia) within the Mediterranean sea. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.363, p.130-136, 2008.

SCHIRMER, K.; DIXON, D.G.; GREENBERG, B.M.; BOLS, N.C. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. **Toxicology**, v.127, p.129–141,1998.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v.39, n.1-12, p.48-53, 1999.

SCHOBER, W.; PUSCH, G.; OEDER, S.; REINDL, H.; BEHRENDT, H.; BUTERS, J.T. Metabolic activation of phenanthrene by human and mouse cytochromes P450 and pharmacokinetics in CYP1A2 knockout mice. **Chemico-Biological Interactions**, v.183, p.57-66, 2010.

SEABRA PEREIRA, C.D.; MARTIN-DÍAZ, M. L.; ZANETTE, J.; CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; ABESSA, D.M.S.; CATHARINO, M.G.; VASCONCELLOS, M.B.; BAINY, A.C.D.; DE SOUSA, E.C.; DEL VALLS, T.A., Integrated biomarker responses as environmental status

descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1257-1264, 2011.

SERESHK, Z.H.; BAKHTIARI, A.R. Distribution patterns of PAHs in different tissues of annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) and short sea snake (*Lapemis curtus*) from the Hara Protected Area on the North Coast of the Persian Gulf, Iran. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.109, p.116–123, 2014.

SHENAI-TIRODKAR, P.S.; GAUNS, M.U.; MUJAWAR, M.W.A.; ANSARI, Z.A. Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.142, p.87-94, 2017.

SHIRDEL, I.; KALBASSI, M.R.; SHOKRI, M.; OLYAEI, R.; SHARIFPOUR, I. The response of thyroid hormones, biochemical and enzymological biomarkers to pyrene exposure in common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.130, p.207-213, 2016.

SHUMWAY, S.E., Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentration in the hemolymph of bivalve molluscs. **Marine Biology**, v.41, p.153-177, 1977.

SHUMWAY, S.E.; YOUNGSON, A., The effects of fluctuating salinity on the physiology of *Modiolus demissus* (Dillwyn). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.40, p.167-181, 1979.

SIEBERT, M.N. **Atividade 7-etoxi-resorufina O-deetilase em ostras *Crassostrea* sp. e níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.** Tese (Doutorado em Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SILVA, G. B.; ABSHER, T. M., Variação Temporal de Larvas de Ostras *Crassostrea* (Sacco, 1897), na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Em: **VI Congresso Latinoamericano De Ciencias Del Mar**, 1995, Mar

del Plata. Resúmenes VI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Mar Del Plata, p.114. 1995.

SINAEI, M. Effect of 16 pure hydrocarbons on the stabilization and lysis of fish (mudskipper: *Boleophthalmus dussumieri*) erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 257–265, 2013.

SINGARAJAH, K.V., On the taxonomy, ecology and physiology of a giant oyster, *Crassostrea paraibanensis*, a new species. **Bulletin of Marine Science**, v.30, p.833-847, 1980.

SMALL, C.; NICHOLLS, R.J., A global analysis of human settlement in coastal zones. **Journal of Coastal Research**, v.19, p.584-599, 2003.

SOLÉ, M.; BUET, A.; ORTIZ, L.; MAYNOU, F.; BAYONA, J. M.; ALBAIGÉS, J., Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the Prestige fuel oil. **Scientia Marina**, v.71, p.373-382, 2007.

SOMERO, G.N.; BOWLUS, R.D., Osmolyte and metabolic end products of molluscs: the design of compatible solute systems. Em: Hochachka, P.W (ed). **Mollusca**, Academic Press, New York, v.2, p.77-100. 1983.

STEPHENS, G.C.; SCHINSKE, R.A., Uptake of amino acids by marine invertebrates. **Limnology and Oceanography**, v.6, p.175-181, 1961.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1715–1733, 1996.

STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; COGLIANO V. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **The Lancet Oncology**, v.6, n.12, p.931-932, 2005.

SUN, Y.; YU, H.; ZHANG, J.; YIN, Y.; SHI, H.; WANG, X. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. **Chemosphere**, v.63, p.1319-1327, 2006.

TAN, Y.L.; KONG, A.; MONETTI, M.A., Biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an Alaskan Arctic Lake sediment. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v.9, p.185-192, 1996.

TEIXEIRA, M.; ALMEIDA, Â.; CALISTO, V.; ESTEVES, V.I.; SCHNEIDER, R.J.; WRONA, F.J.; SOARES, A.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Toxic effects of the antihistamine cetirizine in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Water Research**, v.114, p.316-326, 2017.

TELESH, I.V.; KHLEBOVICH, V.V., Principal processes within the estuarine salinity gradient: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v.61, p.149-155, 2010.

THOMAS, P.; WOFFORD, H.W.; NEFF, J.M. Biochemical stress responses of striped mullet (*Mugil cephalus*) to fluorene analogs. **Aquatic Toxicology**, v.1, p.329-342, 1981.

TIMBRELL, J.A. Biomarkers in toxicology. **Toxicology**, v.129, n.1, p.1-2, 1998.

TRAN, T.K.A.; MACFARLANE, G.R.; KONG, R.Y.C.; O'CONNOR, W.A. YU, R.M.K. The constitutively active estrogen receptor (ER) binds and activates the promoter of the vitellogenin (Vtg) gene in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Marine Pollution Bulletin**, In Press, 2017.

US, United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects: The 2015 Revision, World Population**. New York, 2015. Disponível em: https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/World_Population_2015_Wallchart.pdf Acesso em: Dezembro, 2016.

VAN DER OOST, R.; GOKSOYR, A.; CELANDER, M.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N.P.E. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. **Aquatic Toxicology**, v.36, p.189-222, 1996.

VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N.; TAGLIARO, C.H., Molecular phylogeny of

mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**, v.73, p.229-234, 2007.

VASANTHI, L.A.; REVATHI, P.; BABU RAJENDRAN, R.; MUNUSWAMY, N. Detection of metal induced cytopathological alterations and DNA damage in the gills and hepatopancreas of green mussel *Perna viridis* from Ennore Estuary, Chennai, India. **Marine Pollution Bulletin**, v.117, n.1-2, p.41-49, 2017.

VERDELHOS, T.; MARQUES, J.C.; ANASTÁCIO, P., The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. **Ecological Indicators**, v.52, p.96-104, 2015.

VILANOVA, M.F.V.; CHAVES, E.M.B., Contribuição para o conhecimento da viabilidade do cultivo de ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828, Mollusca: Bivalvia), no estuário do rio Ceará, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.27, p.111-125, 1988.

WAHIDULLA, S.; RAJAMANICKAM, Y.R., Detection of DNA damage in fish *Oreochromis mossambicus* induced by co-exposure to phenanthrene and nitrite by ESI-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v.17, n.2, p.441-452, 2010.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology: Taylor & Francis**, 321p. 1996.

WANG, Y.; HU, M.; CHEUNG, S.G.; SHIN, P.K.S.; LU, W.; LI, J., Antipredatory responses of *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) under acute hypoxia and low salinity. **Journal of Molluscan Studies**, v.79, p.42-50, 2013.

WENDT, D.E.; JOHNSON, C.H., Using latent effects to determine the ecological importance of dissolved organic matter to marine invertebrates. **Integrative and Comparative Biology**, v.46, p.634-642, 2006.

WU, H.; LIU, X.; ZHAO, J.; YU, J., NMR-based metabolomic investigations on the differential responses in adductor muscles from two pedigrees of Manila clam *Ruditapes philippinarum* to cadmium and zinc. **Marine Drugs**, v.9, p.1566-1579, 2011.

WHES, World Hunger Education Service. **2016 World Hunger and Poverty Facts and Statistics**. Washington, 2016. Disponível em: <http://www.worldhunger.org/2015-world-hunger-and-poverty-facts-and-statistics/#hunger-number> Acesso em: Dezembro, 2016.

WRIGHT, S.H., Amino acid transport in the gills epithelium of a marine bivalve. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology**, v.90, n.4, p.635-641, 1988.

XIE, J.; ZHAO, C.; HAN, Q.; ZHOU, H.; LI, Q.; DIAO, X. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.63, p. 237-244, 2017.

XU, J.; YU, Y.; WANG, P.; GUO, W.; DAI, S.; SUN, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments from Yellow River, China. **Chemosphere**, v.67, p.1408-1414, 2007.

YANCEY, P.H., Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p.2819-2830, 2005.

YANCHESHMEH, R.A.; BAKHTIARI, A.R.; MORTAZAVI, S.; SAVABIEASFAHANI, M. Sediment PAH: contrasting levels in the Caspian Sea and Anzali Wetland. **Marine Pollution Bulletin**, v.84, n.1, p.391-400, 2014.

YIN, Y.; JIA, H.; SUN, Y.; YU, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.145, n.2, p.288-293, 2007.

ZACCARON DA SILVA, A.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D., Effects of

salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.376-382, 2005.

ZACCHI, F.L. **Respostas bioquímicas e moleculares em *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) coletadas em duas baías do Sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 104p. 2013.

ZACCHI, F.L.; LIMA, D.; FLORES-NUNES, F.; MATTOS, J.J.; LÜCHMANN, K.H.; GOMES, C.H.A.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S.T.; BAINY, A.C.D. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v.183, p.94-103, 2017.

ZANETTE, J.; DE ALMEIDA, E. A.; DA SILVA, A. Z.; GUZENSKI, J.; FERREIRA, J. F.; DI MASCIO, P.; MARQUES, M. R.; BAINY, A. C. D., Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. **Science of the Total Environment**, v.409, p.1976-1983, 2011.

ZHANG, Y.; CREMER, P.S., Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.658-663, 2006.

ZHANG, Y.; ZHU, Y.X.; KWON, K.K.; PARK, J.H.; KIM, S.J. Novel method for determining pyrene biodegradation using synchronous fluorimetry. **Chemosphere**, v.55, p.389-394, 2004.

ZHANG, G.; FANG, X.; GUO, X.; LI, L.; LUO, R.; XU, F.; YANG, P.; ZHANG, L.; WANG, X.; QI, H.; XIONG, Z.; QUE, H.; XIE, Y.; HOLLAND, P. W.; PAPS, J.; ZHU, Y.; WU, F.; CHEN, Y.; WANG, J.; PENG, C.; MENG, J.; YANG, L.; LIU, J.; WEN, B.; ZHANG, N.; HUANG, Z.; ZHU, Q.; FENG, Y.; MOUNT, A.; HEDGECOCK, D.; XU, Z.; LIU, Y.; DOMAZET-LOSO, T.; DU, Y.; SUN, X.; ZHANG, S.; LIU, B.; CHENG, P.; JIANG, X.; LI, J.; FAN, D.; WANG, W.; FU, W.; WANG, T.; WANG, B.; ZHANG, J.; PENG, Z.; LI, Y.; LI, N.; CHEN, M.; HE, Y.; TAN, F.; SONG, X.; ZHENG, Q.; HUANG, R.; YANG, H.; DU, X.; CHEN, L.; YANG, M.; GAFFNEY, P. M.;

WANG, S.; LUO, L.; SHE, Z.; MING, Y.; HUANG, W.; HUANG, B.; ZHANG, Y.; QU, T.; NI, P.; MIAO, G.; WANG, Q.; STEINBERG, C. E.; WANG, H.; QIAN, L.; LIU, X.; YIN, Y., The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v.490, p.49-54, 2012.

ZHANG, Y.; SUN, J.; MU, H.; LI, J.; ZHANG, Y.; XU, F.; XIANG, Z.; QIAN, P. Y.; QIU, J. W.; YU, Z., Proteomic basis of stress responses in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Proteome**, v.14, n.1, p.304-317, 2015.

ZHAO, X.; YU, H.; KONG, L.; LI, Q., Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **PLoS One**, v.7, i.9, e46244, 2012.

ZHAO, X.; YU, H.; KONG, L.; LIU, L.; LI, Q., Comparative transcriptome analysis of two oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis* provides insights into adaptation to hypo-osmotic conditions. **PLoS One**, v.9, n.11, e111915, 2014.

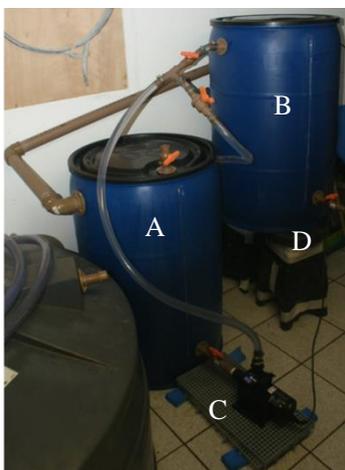
ZHONG, Y.; CARMELLA, S. G.; UPADHYAYA, P.; HOCHALTER, J. B.; RAUCH, D.; OLI-VER, A.; JENSEN, J.; HATSUKAMI, D.; WANG, J.; ZIMMERMAN, C.; HECHT, S. S., Immediate consequences of cigarette smoking: rapid formation of polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides. **Chemical Research in Toxicology**, v.24, n.2, p.246-252, 2011.

APÊNDICE A

Sistema de filtração de efluentes contaminados por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Após a realização dos experimentos dos Capítulos 2 e 3, a água utilizada na exposição dos animais, contendo fenantreno (Capítulo 2), pireno e fluoreno (Capítulo 3) não depletados ou consumidos pelas ostras, foi destinada a um sistema de filtração. Esse sistema foi montado com a finalidade de garantir o destino adequado dos efluentes gerados por meio de contenção do volume total de resíduos e tratamento por filtração em sistema de recirculação. O sistema foi desenvolvido pelo Engenheiro de Aquicultura Dr. Fabrício Flores Nunes, e montado no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), antes da realização dos experimentos. Em cada troca de água dos aquários de exposição, todo o volume de água utilizado foi estocado em uma bombona de polipropileno com capacidade para 200 L (Figura 1A), conectada a um sistema de recirculação e a outra bombona de igual volume (Figura 1B). A água foi bombeada com auxílio de uma bomba hidráulica Cubos Orca 4800 L/h (Figura 1C).

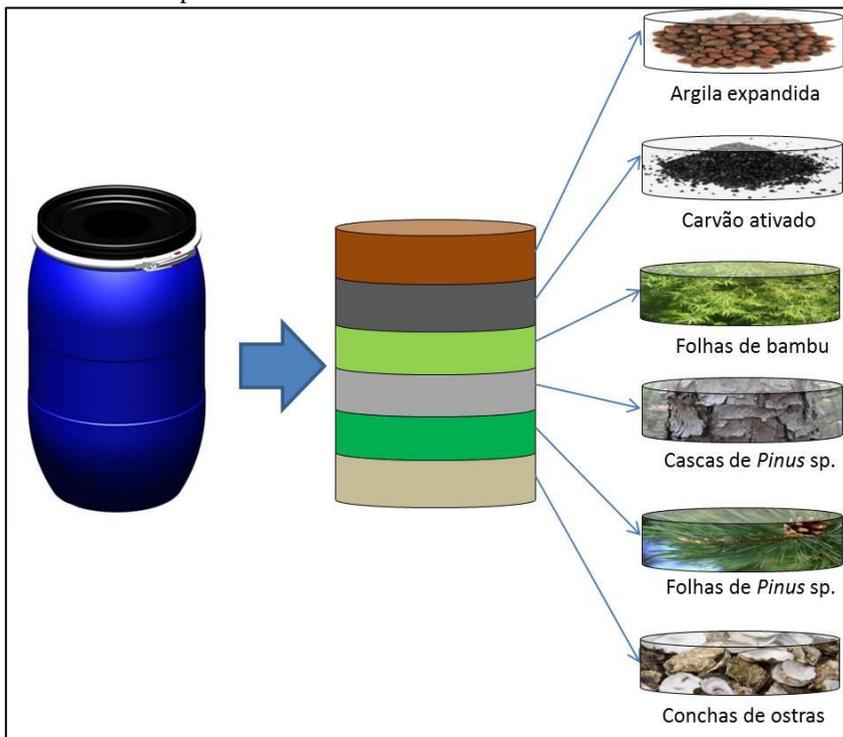
Figura 1. Sistema de filtração de efluentes composto de duas bombonas com capacidade para 200 L, cada. (A): Bombona para estoque de água; (B): Bombona com elementos filtrantes; (C) Bomba hidráulica; (D) Torneira para coleta de amostra.



Fonte: ZACCHI, F.L. (Arquivo pessoal).

Em uma das bombonas, foram adicionados elementos filtrantes, quais sejam: argila expandida (DORDIO et al., 2010; DONG et al., 2011; NKANSAH et al., 2012; DORDIO; CARVALHO, 2013; SHAVISI et al., 2013), carvão ativado (GUO; KAPLAN; KARANFIL, 2008), folhas de bambu, cascas de *Pinus sp.* (LI; CHEN; ZHU, 2010), Folhas de *Pinus sp.* (CHEN; YUAN; LIU, 2011; XI; CHEN, 2014), e conchas de ostras moídas, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2. Elementos filtrantes utilizados no sistema para retenção dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.



Fonte: FLORES-NUNES, F. (Arquivo pessoal).

A água de entrada no sistema, contendo os efluentes não depletados ou consumidos pelas ostras dos experimentos, permaneceu por um período de 24 h para tratamento. Foram realizadas amostragens de água de entrada e de saída, após as 24 h de recirculação no sistema. As amostragens foram realizadas a partir de um mL de água de entrada ou de saída, imediatamente quantificadas por leitura fluorimétrica (para

Fenantreno: 240 nm excitação / 360 nm emissão; para Pireno: 270 nm excitação / 384 nm emissão; para Fluoreno: 258 nm excitação / 313 nm emissão) em espectrofluorímetro (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e transformadas em concentração do respectivo HPA a partir de uma diluição seriada de 2 mg. L⁻¹ do HPA como curva padrão de referência.

Para a realização das análises estatísticas, foi utilizada a média de três amostragens da água de entrada e de saída. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney, com diferenças significativas consideradas para $p < 0,05$, em *software* GraphPad Prism 5.0.

Os resultados da eficiência do sistema de filtração do fenantreno estão demonstrados da Figura 3, do pireno na Figura 4 e do fluoreno na Figura 5.

Figura 3. Concentração relativa do fenantreno em água utilizada no experimento do Capítulo 2. Entrada: água residual pós experimento; Saída: água após 24 h em sistema de filtração. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).

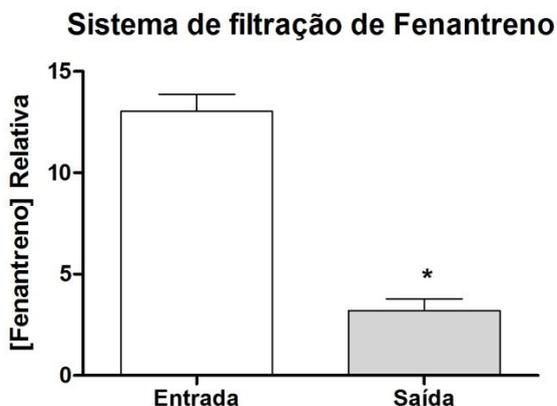


Figura 4. Concentração relativa do pireno em água utilizada no experimento do Capítulo 3. Entrada: água residual pós experimento; Saída: água após 24 h em sistema de filtração. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).

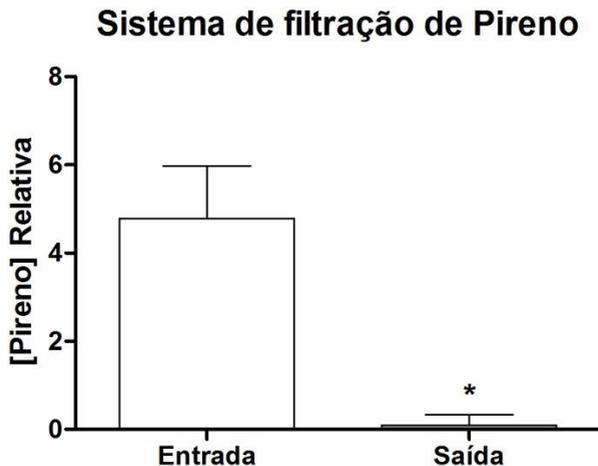
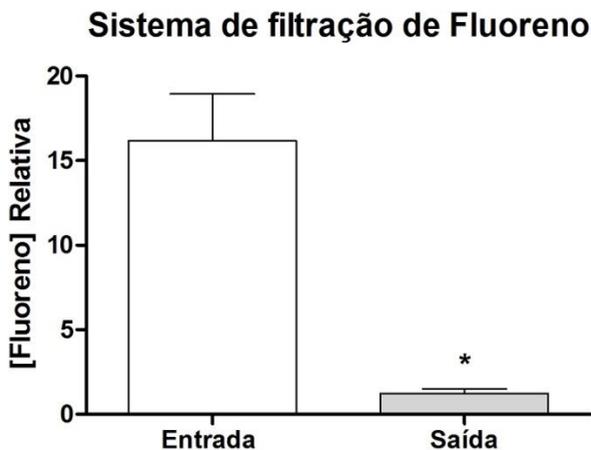


Figura 5. Concentração relativa do fluoreno em água utilizada no experimento do Capítulo 3. Entrada: água residual pós experimento; Saída: água após 24 h em sistema de filtração. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).



Conforme demonstrado nas Figuras 3, 4 e 5, o sistema de filtração de HPAs foi capaz de reter o fenantreno, pireno e fluoreno ainda remanescente dos experimentos e não consumidos pelas ostras. As quantidades remanescentes após a passagem pelo sistema de filtração apresentaram valores muito abaixo das concentrações em que há a possibilidade de risco ou perigo aos animais e seres humanos em ambientes aquáticos, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency - US EPA*), (EPA, 2015) a União Europeia (EU, 2011) e a resolução vigente do CONAMA 454/2012 para HPAs em sedimento (CONAMA, 2012). A resolução vigente do CONAMA 357/2005 para HPAs em água do mar, não cita os HPAs fenantreno, pireno e fluoreno (CONAMA, 2012).

Os rejeitos sólidos provenientes do sistema de filtração após a realização dos experimentos foram apropriadamente acondicionados e destinados como descarte à Gestão de Resíduos Sólidos da UFSC.

Nesse contexto, conclui-se que o sistema de filtração desenvolvido e montado no LABCAI/UFSC é eficiente para tratamento dos efluentes de experimentos realizados com os HPAs fenantreno, pireno e fluoreno. É necessário, no entanto, realizar testes com outros HPAs para verificar a abrangência de tal sistema.

Referências bibliográficas

CHEN, B.; YUAN, M.; LIU, H., Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution using plant residue materials as a biosorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, n.1-3, p.436-442, 2011.

CONAMA, 2005. Resolução n.357 de 11 de março de 2005. Dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'águas e dá outras providências. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi/4459>.
Acesso em: Fevereiro, 2017.

COAMA, 2012. Resolução n.454 de 01 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi/4459>.
Acesso em: Fevereiro, 2017.

DONG, Z.; LU, M.; HUANG, W.; XU, X., Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier. **Journal of Hazardous Materials**, v.196, p.123-130, 2011.

DORDIO, A.; PALACE CARVALHO, A.J.; TEIXEIRA, D.M.; DIAS, C.B.; PINTO, A.P., Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha spp.* and LECA. **Bioresource Technology**, v.101, n.3, p.886-892, 2010.

DORDIO, A.; CARVALHO, A.J., Constructed wetlands with light expanded clay aggregates for agricultural wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v.463-464, p.454-461, 2013.

DOYOTTE, A.; COSSU, C.; JACQUIN, M.C.; BABUT, M.; VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**, v.39, p.93-110, 1997.

EPA, United States Environmental Protection Agency. Water Quality Benchmarks for Aquatic Life, Washington, DC, 2015. Disponível em: <https://archive.epa.gov/bpspill/web/html/water-benchmarks.html#4>
Acesso em: Janeiro, 2017.

EU, European Union. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) factsheet. Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements JRC 66955, 4^aed, 27 pp., 2011.

GUO, Y.; KAPLAN, S.; KARANFILM T., The significance of physical factors on the adsorption of polyaromatic compounds by activated carbons. **Carbon**, v.46, n.14, p.1885-1891, 2008.

LI, Y.; CHEN, B.; ZHU, L., Enhanced sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution by modified pine bark. **Bioresource Technology**, v.101, n.19, p.7307-7313, 2010.

NKANSAH, M.A.; CHRISTY, A.A.; BARTH, T.; FRANCIS, G.W., The use of lightweight expanded clay aggregate (LECA) as sorbent for PAHs removal from water. **Journal of Hazardous Materials**, v.218-218, p.360-365, 2012.

SHAVISI, Y.; SHARIFNIA, S.; ZENDEHZABAN, M.; LOBABI MIRGHAVAMI, M.; KAKEHAZAR, S., Application of solar light for degradation of ammonia in petrochemical wastewater by a floating TiO₂/LECA photocatalyst. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n.5, p.2806-2813, 2014.

XI, Z.; CHEN, B., Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution by raw and modified plant residue materials as biosorbents. **Journal of Environmental Sciences**, v.26, n.4, p.737-748, 2014.

APÊNDICE B

Levantamento de potenciais genes normalizadores em transcriptoma de glândula digestiva de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em quatro locais do litoral brasileiro.

Caracterização do problema

Estudos envolvendo os níveis de transcrição gênica são realizados com frequência na busca de novos biomarcadores de contaminação aquática e na identificação de vias e processos celulares e do desenvolvimento (FENG et al., 2013; LÜCHMANN et al., 2015; MILAN et al., 2013; SERRANO et al., 2015; ZACCHI et al., 2017). Para esses estudos, a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é normalmente utilizada e mostra-se vantajosa devido a sua sensibilidade, velocidade e especificidade (ARTICO et al., 2010; SANG et al., 2013). Para assegurar a confiabilidade e exatidão das análises de qPCR, é necessária a aplicação de genes de referência para normalizar as diferenças amostrais e as variações provenientes da execução das reações, como variações na quantidade de material; variações entre as extrações de RNA e eficiência na transcrição reversa (HUGGETT et al., 2005; RADONIC et al., 2004). Estudos realizados em nosso laboratório envolvendo análises de transcrição gênica em moluscos bivalves e peixes expostos a diferentes contaminantes ambientais, frequentemente encontram contratempos e dificuldades na utilização de um ou mais genes de referência que normalizem os dados entre os grupos experimentais. Em função disso, a normalização da técnica de qPCR torna-se um dos maiores desafios e reforça a importância na busca por genes de referência.

Durante o projeto *Gene expression profiling of marine-estuarine bivalves from Brazil: applications of basic sciences as a tool in environmental monitoring* foram coletadas amostras da ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* - espécie de ampla distribuição ao longo da costa brasileira – em dois locais de São Paulo-SP, e dois locais de Florianópolis-SC. A análise do transcriptoma de glândulas digestivas foi realizada, e para a validação dos genes diferencialmente transcritos entre os locais de coleta, faz-se necessário o levantamento dos potenciais genes normalizadores a serem usados neste e em outros estudos semelhantes.

Metodologia

Ostras *Crassostrea rhizophorae* foram coletadas em quatro locais da costa brasileira: São Paulo-SP: Bora Bora (Referência) e São Vicente

(Contaminado) e Florianópolis-SC: Sambaqui (Referência) e Rio Bücheller (Contaminado) (Figura 1).

Figura 1. Mapa demonstrando os locais no Brasil e datas de coleta de *Crassostrea rhizophorae*. Locais de São Paulo – SP: Bora Bora (Referência) e São Vicente (Contaminado) e locais de Santa Catarina – SC: Sambaqui (Referência) e Rio Bücheller (Contaminado).



Fonte: Google Maps, 2017 (Adaptada).

As glândulas digestivas de trinta ostras por local de coleta foram extraídas e agrupadas em seis *pools* de cinco amostras cada. Cinco *pools* por local de coleta foram utilizados para a síntese de bibliotecas de cDNA, posteriormente sequenciadas em Illumina Hi-Seq 2500. A partir das sequências obtidas, a montagem *de novo* dos transcritos foi realizada utilizando o programa Velvet-Oases (SCHULZ et al., 2012). Os transcritos gerados foram anotados por homologia através da ferramenta blastp (ALTSCHUL et al., 1997) utilizando o banco Swiss-Prot (BOECKMANN et al., 2003). As leituras oriundas do sequenciamento Illumina foram mapeadas nos transcritos utilizando o pseudo-alinhador KALLISTO (BRAY et al., 2016). A transcrição diferencial foi inferida a partir das abundâncias relativas e calculadas par a par através do pacote EdgeR (ROBINSON; McCARTHY; SMYTH, 2010). Para avaliar os

genes de referência, os dados de variação em logFC foram convertidos para a razão de FC (*fold change* = $2^{\log FC}$). Foram selecionados os genes com razão de FC variando entre 0,99 e 1,01. Em seguida, os genes foram filtrados pelos valores de logCPM acima de cinco (valores de abundância normalizados pelo pacote EdgeR). Os transcritos foram avaliados por sua anotação e então selecionados manualmente através de dois critérios: as funções biológicas de cada gene e a literatura disponível sobre genes normalizadores em moluscos bivalves.

Genes selecionados

Após a filtragem, 342 genes foram utilizados para a busca dos potenciais normalizadores, de um total de 18.502 transcritos considerando todos os *pools* e grupos avaliados. Destes, 51 genes não foram anotados (aproximadamente 15%), resultando em um total de 291 genes. Dentre esses, os 30 transcritos apresentando maior valor de logCPM estão demonstrados na Tabela 1.

Em estudos de análises de normalizadores em moluscos bivalves nas mais diversas condições experimentais, os genes comumente sugeridos pertencem à classe das proteínas ribossomais, estão relacionados ao citoesqueleto ou envolvidos em processos biológicos como metabolismo de carboidratos; transporte de vesículas; regulação de proteínas; tradução; desenovelamento de RNA (Tabela 2).

Como resultado do filtro aplicado para os transcritos de *C. rhizophorae*, foram sugeridos como potenciais genes normalizadores: genes ribossomais (RIB60S), genes de citoesqueleto (ACT e ANK), envolvidos no processo de tradução (EF1) e desenovelamento de RNA (HELI) e transporte de vesículas (ARF1) (Tabela 3).

Estes genes, após testados e validados, poderão ser utilizados nas normalizações de estudos de qPCR do projeto *Gene expression profiling of marine-estuarine bivalves from Brazil: applications of basic sciences as a tool in environmental monitoring* e demais estudos a serem realizados com ostras *C. rhizophorae*.

Tabela 1. Relação dos trinta genes mais vezes transcritos (logCPM de maior valor) após filtragem por valores de razão FC entre 0,99 e 1,01 com seus respectivos códigos de acesso do Uniprot.

Anotação	Acesso Uniprot	logFC	RazãoFC	logCPM
<i>Acidic mammalian chitinase</i>	sp Q6RY07 CHIA_RAT	-0,02	0,99	11,31
<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	sp Q9U3U0 RLA0_CERCA	-0,01	1,00	10,52
<i>60S ribosomal protein L11</i>	sp P62914 RL11_RAT	-0,01	0,99	10,13
<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	sp Q05825 ATPB_DROME	-0,01	1,00	10,12
<i>Actin-3</i>	sp P07829 ACT3_DICDI	0,00	1,00	10,05
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	sp Q16956 GRP78_APLCA	0,01	1,01	9,35
<i>60S ribosomal protein L23</i>	sp P48159 RL23_DROME	-0,02	0,99	9,12
<i>Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3</i>	sp P55906 BGH3_BOVIN	-0,01	0,99	9,07
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B</i>	sp Q99020 ROAA_MOUSE	0,02	1,01	8,92
<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial</i>	sp O46578 COX41_GORGO	-0,01	0,99	8,47
<i>NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial</i>	sp Q13423 NNTM_HUMAN	0,02	1,01	8,46
<i>Nose resistant to fluoxetine protein 6</i>	sp Q09225 NRF6_CAEEL	0,02	1,01	8,45
<i>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta</i>	sp O75439 MPPB_HUMAN	0,00	1,00	8,39
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase</i>	sp Q91YQ5 RPNI_MOUSE	0,01	1,01	8,35
<i>Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial</i>	sp P07143 CY1_YEAST	0,00	1,00	8,30

Continuação...

Anotação	Acesso Uniprot	logFC	RazãoFC	logCPM
<i>Thyroid receptor-interacting protein 11</i>	sp Q15643 TRIPB_HUMAN	-0,02	0,99	8,12
<i>Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial</i>	sp P12074 CX6A1_HUMAN	0,01	1,00	8,11
<i>Elongation factor 1-delta</i>	sp Q4R3D4 EF1D_MACFA	0,02	1,01	8,09
<i>Ankyrin-3</i>	sp G5E8K5 ANK3_MOUSE	0,02	1,01	8,05
<i>Max dimerization protein 1</i>	sp P50538 MAD1_MOUSE	0,02	1,01	8,04
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12</i>	sp Q9D8W5 PSD12_MOUSE	0,02	1,01	8,04
<i>Catalase</i>	sp Q9PWF7 CATA_RUGRU	0,01	1,01	8,03
<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic</i>	sp P62716 PP2AB_RAT	-0,01	0,99	8,02
<i>Cathepsin L</i>	sp Q26534 CATL_SCHMA	-0,01	1,00	7,99
<i>Translocon-associated protein subunit alpha</i>	sp A6QLP7 SSRA_BOVIN	-0,02	0,99	7,97
<i>Actin, cytoplasmic 3</i>	sp P53486 ACTB3_TAKRU	0,01	1,01	7,90
<i>Complement C1q-like protein 4</i>	sp Q86Z23 C1QL4_HUMAN	0,00	1,00	7,89
<i>Ceramide glucosyltransferase</i>	sp Q5BL38 CEGT_XENTR	0,01	1,01	7,89
<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	sp Q5ZM98 GRP75_CHICK	0,02	1,01	7,87

Tabela 2. Revisão bibliográfica de estudos com normalizadores em moluscos bivalves. *TUB*: *tubulina*; *UBQ*: *ubiquitina*; *ANK*: *anquirina*; *GAPDH*: *gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase*; *ACT*: *actina*; *RIB*: *ribossomal*; *EF*: *fator de elongação*; *ARF*: *fator de ribosilação*; *HELI*: *helicase*.

Espécie	Condição experimental	Genes normalizadores sugeridos	Referência
<i>Crassostrea angulata</i>	Diferentes tecidos	β - <i>TUB</i> ; <i>UBQ</i>	Pu; Yang; Ke, 2015
<i>Crassostrea brasiliana</i>	Salinidade, temperatura, fenantreno e óleo diesel	<i>ANK</i> ; β - <i>TUB</i> ; α - <i>TUB</i> ; <i>GAPDH</i> ; β - <i>ACT</i>	Müller et al., 2017
<i>Crassostrea gigas</i>	Desafio viral	<i>RIB</i>	Du et al., 2013
<i>Crassostrea gigas</i>	Estágios iniciais de desenvolvimento	<i>EF1a</i> ; <i>GAPDH</i> ; <i>ARF1</i>	Huan; Wang; Liu, 2016
<i>Mya arenaria</i>	Desafio bacteriano	<i>EF1</i> ; <i>RIB</i> ; <i>UBQ</i>	Araya et al., 2008
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Desafio bacteriano	<i>EF1a</i>	Moreira et al., 2014
<i>Ostrea edulis</i>	Contaminação com protozoários	<i>GAPDH</i> ; <i>EF1a</i>	Morga et al., 2010
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento	<i>UBQ</i> ; <i>HELI</i> ; <i>RIB</i>	Feng et al., 2013
<i>Pecten maximus</i>	Gônadas feminas e masculinas	<i>RIB</i> ; <i>EF1a</i> ; <i>GAPDH</i>	Mauriz et al., 2012
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Exposição a cobre	<i>EF1a</i> ; <i>GAPDH</i> ; β - <i>TUB</i>	Volland; Blasco; Hampel, 2017
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Desafio bacteriano	α - <i>TUB</i>	Moreira et al., 2014

Tabela 3. Genes normalizados selecionados e sugeridos para *Crassostrea rhizophorae*, função biológica relacionada, código de acesso no Uniprot e respectivos valores de logFC, razão de FC e logCPM. *RIB*: ribossomal; *ACT*: actina; *ANK*: anquirina; *EF*: fator de elongação; *RNA HELI*: hélice; *ARF*: fator de ribosilação.

Gene	Função	Acesso Uniprot	logFC	RazãoFC	logCPM
<i>RIB 60Sproteína P0</i>		sp Q9U3U0 RLA0_CERCA	-0,01	1,00	10,52
<i>RIB 60Sproteína L11</i>	Proteína ribossomal	sp P62914 RL11_RAT	-0,01	0,99	10,13
<i>RIB 60Sproteína L23</i>		sp P48159 RL23_DROME	-0,02	0,99	9,12
<i>ACT</i>		sp P53486 ACTB3_TAKRU	0,01	1,01	7,90
<i>ACT</i>		sp Q26065 ACT_PLAMG	-0,02	0,99	6,89
<i>ACT3</i>	Citoesqueleto	sp P07829 ACT3_DICDI	0,00	1,00	10,05
<i>ANK3</i>		sp G5E8K5 ANK3_MOUSE	0,02	1,01	8,05
<i>ANK2</i>		sp Q01484 ANK2_HUMAN	-0,02	0,99	5,38
<i>EF11-delta</i>	Tradução	sp Q4R3D4 EF1D_MACFA	0,02	1,01	8,09
<i>RNA HELI</i>	Desenvolvimento de RNA	sp Q14562 DHX8_HUMAN	0,01	1,01	5,75
<i>ARF1</i>	Transporte de vesículas	sp Q20758 ARL1_CAEEL	-0,01	0,99	5,69

Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ARAYA, M.T.; SIAH, A.; MATEO, D.; MARKHAM, F.; MCKENNA, P.; JOHNSON, G.; BERTHE, F.C.J. Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, p.326-331, 2008.

ARTICO, S.; NARDELI, S.M.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-SA, M.F.; ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, v.10, n.49, p.1-12, 2010.

BOECKMANN, B.; BAIROCH, A.; APWEILER, R.; BLATTER, M.C.; ESTREICHER, A.; GASTEIGER, E.; MARTIN, M.J.; MICHOU, K.; O'DONOVAN, C.; PHAN, I.; PILBOUT, S.; SCHNEIDER, M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.365-370, 2003.

BRAY, N.L.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P.; PACHTER, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature Biotechnology**, v.34, p.525-527, 2016.

DU, Y.; ZHANG, L.; XU, F.; HUANG, B.; ZHANG, G.; LI, L., Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. **Fish and Shellfish Immunology**, v.34, p.939-945, 2013.

FENG, L.; YU, Q.; LI, X.; NING, X.; WANG, J.; ZOU, J.; ZHANG, L.; WANG, S.; HU, J.; HU, X.; BAO, Z. 2013. Identification of reference

genes for qRT-PCR analysis in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. **PLoS One**, v.8, p.1–10, 2013.

HUAN, P.; WANG, H.; LIU, B. Assessment of housekeeping genes as internal references in quantitative expression analysis during early development of oyster. **Genes and Genetic Systems**, v.91, p.257-265, 2016.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization, strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v.6, p.279-284, 2005.

LÜCHMANN, K.H.; CLARK, M.S.; BAINY, A.C.D.; GILBERT, J.A.; CRAFT, J.A.; CHIPMAN, J.K.; THORNE, M.A.S.; MATTOS, J.J.; SIEBERT, M.N.; SCHROEDER, D.C., Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress response revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic Toxicology**, v.166, p.10-20, 2015.

MAURIZ, O.; MANEIRO, V.; PÉREZ-PARALLÉ, M.L.; SÁNCHEZ, J.L.; PAZOS, A.J., Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies on the gonad of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. **Aquaculture**, v.370-371, p.158-165, 2012.

MILAN, M.; PAULETTO, M.; PATARNELLO, T.; BARGELLONI, L.; MARIN, M.G.; MATOZZO, V. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquatic Toxicology**, v.126, p.17–29, 2013.

MOREIRA, R.; PEREIRO, P.; COSTA, M.M.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Evaluation of reference genes of *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes philippinarum* infected with three bacteria strains for gene expression analysis. **Aquatic Living Resources**, v.27, p.147-152, 2014.

MORGA, B.; ARZUL, I.; FAURY, N.; RENAULT, T., Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. **Fish and Shellfish Immunology**, v.29, p.937-945, 2010.

MÜLLER, G.D.; LIMA, D.; ZACCHI, F.L.; PIAZZA, R.S.; LÜCHMANN, K.H.; MATTOS, J.J.; SCHLENK, D.; BAINY, A.C.D., Analysis of transcriptional responses of normalizing genes on *Crassostrea brasiliiana* under different experimental conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2017.

PU, F.; YANG, B.; KE, C. Characterization of reference genes for qPCR analysis in various tissues of the Fujian oyster *Crassostrea angulata*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.33, p.838-845, 2015.

RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.313, p.856-862, 2004.

ROBINSON, M.D.; MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v.26, p.139-140, 2010.

SANG, J.; HAN, X.; LIU, M.; QIAO, G.; JIANG, J.; ZHUO, R. Selection and validation of reference genes for real-time quantitative PCR in hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* under different heavy metals stresses. **PLoS One**, v.8, n.12, e82927, 2013.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, p.1101-1108, 2008.

SCHULZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, v. 28, n.8, p.1086-1092, 2012.

SERRANO, M.A.S.; GONZALEZ-REY, M.; MATTOS, J.J.; FLORES-NUNES, F.; MELLO, A.C.P.; ZACCHI, F.L.; PIAZZA, C.E.; SIEBERT, M.N.; PIAZZA, R.S.; ALVAREZ-MUÑOZ, D.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; BEBIANNO, M.J.; GOMES, C.H.A.M.; MELO, C.M.R.; BAINY, A.C.D. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in

Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollutant Response**, v.22, n.22, p. 17375–17385, 2015.

VOLLAND, M.; BLASCO, J.; HAMPEL, M. Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary *Ruditapes philippinarum* hemocytes. **Aquatic Toxicology**, v.185, p.86-94, 2017.

ZACCHI, F.L.; LIMA, D.; FLORES-NUNES, F.; MATTOS, J.J.; LÜCHMANN, K.H.; GOMES, C.H.A.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S.T.; BAINY, A.C.D. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v.183, p.94-103, 2017.