



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Daína de Lima

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH EM RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E  
MOLECULARES DE OSTRAS *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS A  
FENANTRENO**

Florianópolis

2019

Daína de Lima

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH EM RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E  
MOLECULARES DE OSTRAS *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS A  
FENANTRENO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de doutora em  
Bioquímica.  
Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis

2019

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

Lima, Daina  
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH EM RESPOSTAS  
BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DE OSTRAS *Crassostrea brasiliana*  
EXPOSTAS A FENANTRENO / Daina Lima ; orientador, Afonso  
Celso Dias Bainy, 2019.  
105 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. temperatura. 3. pH. 4. *Crassostrea*  
*brasiliana*. 5. fenantreno. I. Bainy, Afonso Celso Dias.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica. III. Título.

Daína de Lima

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH EM RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES  
DE OSTRAS *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS A FENANTRENO**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Eduardo Alves De Almeida  
Universidade Regional de Blumenau

Prof. Dr. Igor Dias Medeiros  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Karim Hahn Lüchmann  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Profa. Dra. Juliana Righetto Moser  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Farina  
Universidade Federal De Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

---

Prof. Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa

---

Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy  
Orientador

Florianópolis, 05 de Agosto de 2019.

*Dedico este trabalho*

*A minha mãe, por todo o amor, força e apoio em todos os momentos.*

*Às minhas irmãs, cuja alegria e amor sempre iluminam a minha vida,*

*Vocês são a minha inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Afonso C. D. Bainy, por toda confiança e apoio durante a execução desse trabalho. Esses cinco anos foram de intenso aprendizado para mim, e agradeço muito a paciência que demonstrou em todos os momentos.

Ao Jacó, que desde o primeiro momento me fez sentir parte do LABCAI. Com certeza, sem sua ajuda grande parte do trabalho não seria possível. Obrigada por todos os ensinamentos e pela participação em todas as etapas desse trabalho. Também à Marília, que com seu otimismo sempre conseguiu anular um pouco da minha “rabugence”. Muito obrigada aos dois, pela amizade e confiança.

A todos os colegas do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, que me acolheram tão bem nesses cinco anos. Ao Fabrício Flores Nunes, Clei Endrigo Piazza, Miguel Angel Saldaña Serrano e Álvaro Cavaler Pessoa de Mello, por toda a ajuda no primeiro experimento, seja na organização, coleta ou análises realizadas. Muito obrigada.

Agradeço o Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, por todo apoio na execução das análises de peroxidação lipídica. Sempre irei agradecer-lo por me ensinar a amar a Ecotoxicologia, e ao incentivo a me tornar melhor naquilo que me propus a fazer. E também a todos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, que foi minha casa durante tanto tempo, e que tenho um carinho enorme.

Agradeço ao Prof. Dr. Igor Dias Medeiros, que cedeu seu laboratório e recursos para execução do segundo experimento desta tese. Além do apoio em toda a logística e domingo perdido em coleta. Também agradeço aos alunos do Prof. Igor, Jhonatas, Natacha e Carolina. Todos que foram essenciais na realização desse experimento.

Um agradecimento mais que especial às Bitchucas, minhas queridas Bárbara, Camila, Flávia, Gabi, Ísis, Lila e Rômi. Vocês foram minha família aqui em Florianópolis todos esses anos. Muito obrigada por toda ajuda na bancada, cada uma de vez foi essencial em uma parte da execução dessa tese. E muitíssimo obrigada pelo “empurrão” nessa fase final! Amo vocês!

À Dra. Márcia C. Bicego, Dra. Satie Taniguchi e Silvio T. Sasaki, do Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO-USP, pelas análises de hidrocarbonetos nos tecidos das ostras.

Gostaria ainda de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao Prof. Dr. Claudio Melo, do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) por ceder as ostras utilizadas nos experimentos. Um obrigada especial ao Carlos Henrique Araújo de Miranda Gomes, pelo cuidado e aclimatação das ostras.

Aos membros da banca examinadora por ceder seu tempo e disponibilidade para ler e contribuir com esse trabalho.

## RESUMO

Com o desenvolvimento industrial o dióxido de carbono presente na atmosfera tem aumentado e causado uma acidificação dos corpos d'águas, incluindo os oceanos. Mudanças na temperatura da água e pH podem causar estresse sobre e influenciar a capacidade de resposta dos organismos aquáticos frente à exposição aos xenobióticos. Dentre esses xenobióticos, o fenantreno (PHE), utilizado como um composto modelo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) possui uma alta reatividade biológica. Animais estuarinos, como a ostra *Crassostrea brasiliana*, possuem mecanismos fisiológicos e bioquímicos de adaptação e tolerância às variações de temperatura e pH desses ambientes. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da temperatura e do pH sobre a transcrição de genes relacionados com a biotransformação [(citocromo P450 (*CYP2AU1*, *CYP2-like2*), glutathione S-transferase (*GSTΩ-like*) e sulfotransferase (*SULT-like*)], defesas antioxidantes [catalase (*CAT-like*), glutathione peroxidase (*GPx-like*) e superóxido dismutase (*SOD-like*)], estresse e metabolismo de lipídeos [proteína de choque térmico 70 (*HSP70-like*), proteína de choque térmico 90 (*HSP90-like*), proteína ligante de ácido graxo (*FABP-like*)], enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica em brânquias de ostras *Crassostrea brasiliana* expostas a fenantreno (PHE). As ostras foram expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de PHE em três diferentes temperaturas (18°C, 24°C e 32°C) e pH (pH 6,5; 7,0 e 8,2) por 24 e 96h. Após 24h os níveis de transcritos de *CYP2-like2* e *CYP2AU1* foram menores em ostras mantidas a 32°C, no grupo exposto e controle comparado às demais temperaturas, e de *GSTΩ-like* quando comparado com 18°C. Transcritos de *CYP2-like2* foram maiores no grupo exposto, comparado ao controle em 32°C, após 96h de exposição. *SOD-like* apresentou maior nível de transcritos no grupo exposto de 18°C comparado a seu controle. As enzimas GST, GPx e G6PDH apresentaram maior atividade nas ostras expostas ao PHE na temperatura de 18°C, em relação ao grupo exposto de 32°C. Os níveis de MDA foram menores no grupo exposto de 18°C com relação ao controle. Transcritos de *HSP70-like* foram afetados pelo PHE na temperatura de 32°C. Após 24h, os níveis de transcritos do *CYP2AU1*, *CYP2-like2* e *GSTΩ-like* foram maiores nas ostras do grupo controle do pH 6,5, comparado ao grupo controle no pH 8,2. Ostras expostas ao PHE no pH 8,2 apresentaram menores níveis de transcritos de *CYP2AU1* e *GSTΩ-like* quando comparado a seu controle. Após 96h, os níveis de transcritos de genes que codificam as enzimas antioxidantes apresentaram o efeito do pH (*CAT-like*) e interação (*GPx-like*). Genes relacionados às defesas antioxidantes e biotransformação avaliados foram significativamente afetados pela temperatura, de forma muito mais evidenciada que o efeito do PHE. E o efeito interativo entre o PHE e o pH sugere que em pH menores as ostras foram mais responsivas ao efeito do PHE. O efeito da temperatura e do pH, assim como os efeitos interativos entre temperatura/pH e PHE, devem ser levados em conta antes de utilizar esses e outros genes como potenciais biomarcadores moleculares frente a exposição a PHE.

**Palavras-chave:** *Crassostrea brasiliana*, temperatura, pH, fenantreno.



## ABSTRACT

With the industrial development levels of carbon dioxide present in the atmosphere has increased and caused acidification of water, including the oceans. Changes in water temperature and pH can cause stress on and influence the responsiveness of aquatic organisms to exposure to xenobiotics. Estuarine animals, like oyster *Crassostrea brasiliana* have physiological and biochemical mechanisms of adaptation and tolerance to temperature and pH variations in these environments. The aim of this study was to evaluate the influence of temperature on gene transcription of biotransformation genes [cytochrome P450 (CYP2AU1, CYP2-like2), glutathione S-transferase (GST $\Omega$ -like) and sulfotransferase (SULT-like) ], antioxidant defenses [catalase (CAT-like), glutathione peroxidase (GPx-like) and superoxide dismutase (SOD-like)], lipid stress and metabolism [heat shock protein 70 (HSP70-like), heat shock protein 90 (HSP90-like), fatty acid binding protein (FABP-like)], activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in gills of oyster *C. brasiliana* exposed to phenanthrene (PHE). The oysters were exposed to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of PHE at three different pH temperatures (18°C, 24°C and 32°C) and pH (pH 6.5, 7.0 and 8.2) for 24 and 96h. After 24h the transcript levels of *CYP2-like2* and *CYP2AU1* were lower in oysters maintained at 32°C, in the exposed group and control compared to the other temperatures, and of *GST $\Omega$ -like* when compared to 18°C. *CYP2-like2* transcripts were higher in the exposed group, compared to the control at 32°C, after 96h of exposure. *SOD-like* showed higher level of transcripts in exposed group of 18°C compared to control group. The enzymes GST, GPx and G6PDH showed higher activity in oysters exposed to PHE at 18°C, compared to the exposed group of 32°C. MDA levels were lower in the exposed group at 18°C relative to the control group. HSP70-like transcripts were affected by the PHE at 32°C. After 24h, transcripts levels of *CYP2AU1*, *CYP2-like2* and *GST $\Omega$ -like* were higher in the oysters of the control group of pH 6.5, compared to the control group. Oysters exposed to PHE at pH 8.2 showed lower transcripts levels of *CYP2AU1* and *GST $\Omega$ -like* when compared to their control. Transcription genes of phase I and II of biotransformation was affected by exposure to PHE and pH, mainly after 24 hours of exposure. The interactive effect between PHE and pH suggests that the oysters were more responsive to the PHE effect at lower pH. Only after 96h, the transcript levels of genes encoding to antioxidant enzymes showed the effect of pH (*CAT-like*) and interaction (*GPx-like*). Genes related to antioxidant defenses and biotransformation evaluated were significantly affected by temperature, in more evidenced way than the effect of PHE. The interactive effect between PHE and pH suggests that at lower pH the oysters were more responsive to the PHE effect. The effect of temperature and pH, as well the interactive effects between temperature/pH and PHE, should be taken into account before using these and other genes as potential molecular biomarkers against PHE exposure.

**Keywords:** *Crassostrea brasiliana*, temperature, pH, phenanthrene.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura molecular do fenantreno com destaque para a região de baía. .... 19
- Figura 2 - Variação média global da temperatura superficial de 1880 a 2015, em relação à média de 1951-1980. A linha preta é a média anual e a linha vermelha é a média de cinco anos de corrida. .... 20
- Figura 3 - Dióxido de carbono atmosférico médio mensal no Observatório Mauna Loa, Havaí. Dados medidos de dióxido de carbono (curva vermelha) como fração molar em ar seco. A curva preta representa os dados corrigidos sazonalmente. Os dados são relatados como fração molar seca definida como o número de moléculas de dióxido de carbono dividido pelo número de moléculas de ar seco multiplicado por um milhão (ppm). .... 22
- Figura 4 - Foto representativa da ostra *Crassostrea brasiliana*. .... 29
- Figura 5 - Consumo por ostras *C. brasiliana* (vermelho) e depleção em aquários sem ostras (azul) do fenantreno monitorados por fluorimetria durante 24 h de experimento. .... 46
- Figura 6 - Níveis de fenantreno ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em peso seco, detectados em todo o tecido das ostras nos grupos controle e expostos, antes da exposição e após 96 h de experimento. .... 48
- Figura 7 - Níveis de transcritos relativos dos genes (A) *Proteína de choque térmico 70-like (HSP70-like)*, (B) *Proteína de choque térmico 90-like (HSP90-like)* e (C) *Fatty acid binding protein-like (FABP-like)* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* ( $n=10$ ) expostas a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenantreno, em três diferentes temperaturas ( $18^{\circ}\text{C}$ ,  $24^{\circ}\text{C}$  e  $32^{\circ}\text{C}$ ) por 24h e 96h. O nível de transcrição gênica foi avaliada por qRT-PCR e relativizados pelo controle de  $24^{\circ}\text{C}$ . “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto ( $p<0,05$ ). .... 50
- Figura 8 - Níveis de transcritos relativos dos genes (A) *Citocromo P450 família 2-like (CYP2-like2)* (B) *Citocromo P450 2AU1 (CYP2AU1)*, (C) *Glutathione S-transferase ômega-like (GST $\Omega$ -like)* e (D) *Sulfotransferase-like (SULT-like)* em

brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno, em três diferentes temperaturas. O nível de transcrição gênica foi avaliado por qRT-PCR e relativizados pelo controle de 24°C. “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto numa mesma temperatura ( $p < 0,05$ ). ..... 55

Figura 9 - Níveis de transcritos relativos dos genes (A) *Glutathione peroxidase-like (GPx-like)* (B) *Catalase-like (CAT-like)*, (C) *Superóxido dismutase-like (SOD-like)* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno, em três diferentes temperaturas. O nível de transcrição gênica foi avaliado por qRT-PCR e relativizados pelo controle de 24°C. “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto ( $p < 0,05$ ). ..... 59

Figura 10 - Atividade específica das enzimas (A) Glutathione-S-transferase (B) Glutathione peroxidase, (C) Glicose-6-fosfato desidrogenase, (D) Catalase, (E) níveis de peroxidação lipídica quantificados a partir do malondialdeído (MDA) em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno, em três diferentes temperaturas (18°C, 24°C e 32°C) por 24h e 96h. “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto ( $p < 0,05$ ). ..... 61

Figura 11 - Níveis de fenantreno (µg.g<sup>-1</sup> peso seco) em tecidos moles inteiros de ostras *Crassostrea brasiliana* pré-expostas (T0), controles e expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno por 96 h em três pH diferentes (6,5, 7,0 e 8,2) ( $pool\ n = 10$ ). ..... 79

Figura 12 - Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP2-like2*, (B) *CYP2AU1*, (C) *GSTΩ-like*, (D) *SOD-like*, (E) *CAT-like* e (F) *GPx-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* ( $n = 10$ ) expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2) por 24 e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam médias entre controles. Letras minúsculas comparam médias entre tratamentos. Os asteriscos (\*) indicam diferenças no controle versus fenantreno no

seu pH. Os valores estão representados como nível de transcritos referente ao grupo controle mantido em pH 8,2 ± desvio padrão ( $p < 0,05$ )..... 81

Figura 13 - Atividade enzimática de (A) Superóxido dismutase, (B) Catalase, (C) Glutaciona peroxidase, (D) Glutaciona redutase, (E) Glutaciona S-transferase e (F) níveis de peroxidação lipídica quantificados a partir de malondialdeído (MDA) em brânquias de *Crassostrea brasiliana* (n = 10) expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2) por 24 e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam médias entre controles. Letras minúsculas comparam médias entre tratamentos. Os asteriscos (\*) indicam diferenças no controle versus fenantreno no seu pH. .... 87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores usados para amplificação dos genes por RT-qPCR, seus respectivos nomes, amplicons e função biológica. ....	42
Tabela 2 - Concentração e meia vida do PHE em aquários com e sem ostras, nas temperaturas de 18, 24 e 32°C.....	47
Tabela 3 - Diferenças de inclinação da reta obtidas por regressão linear durante as três primeiras horas de exposição, em aquários com e sem ostras nas temperaturas de 18, 24 e 32°C. ....	48
Tabela 4 - Sequência dos iniciadores usados para amplificação dos genes por RT-qPCR, seus respectivos nomes, amplicons e função molecular. ....	75

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL .....	17
1.1 Contaminação ambiental .....	17
1.2 Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e o Fenantreno .....	18
1.3 Temperatura e pH.....	20
1.4 Biomarcadores de contaminação ambiental.....	23
1.5 Enzimas do sistema de biotransformação .....	24
1.6 Enzimas antioxidantes .....	26
1.7 A ostra nativa <i>Crassostrea brasiliana</i> .....	27
1.8 Objetivo e estrutura da tese.....	29
2 CAPÍTULO 2.....	31
2.1 RESUMO .....	31
2.2 ABSTRACT .....	33
2.3 INTRODUÇÃO.....	34
2.4 OBJETIVOS .....	37
2.4.1 Objetivos Gerais .....	37
2.4.2 Objetivos específicos.....	37
2.5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.5.1 Animais, aclimação e experimento de exposição .....	38
2.5.2 Monitoramento do fenantreno na água do mar.....	39
2.5.3 Bioacumulação do PHE nos tecidos de <i>C. brasiliana</i> .....	40
2.5.4 Biomarcadores moleculares .....	40
2.5.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA .....	40
2.5.4.2 Seleção de genes, desenho dos iniciadores e análises de qPCR em tempo real	41
2.5.5 Biomarcadores bioquímicos .....	43

2.5.5.1	Preparo das amostras e ensaios enzimáticos .....	43
2.5.5.2	Análise dos níveis de peroxidação lipídica .....	44
2.5.6	Análise estatística.....	45
2.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
2.6.1	Concentração do PHE na água do mar e no tecido de ostras.....	46
2.6.2	Respostas transcricionais de genes relacionados ao estresse térmico e metabolismo lipídico em brânquias de <i>C. brasiliiana</i> .....	49
2.6.3	Respostas transcricionais de biotransformação em brânquias de <i>C. brasiliiana</i> .....	54
2.6.4	Respostas transcricionais e enzimáticas de enzimas antioxidantes em brânquias de <i>C. brasiliiana</i> .....	58
2.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
3	CAPÍTULO 3.....	64
3.1	RESUMO.....	64
3.2	ABSTRACT .....	65
3.3	INTRODUÇÃO.....	67
3.4	OBJETIVOS .....	71
3.4.1	Objetivos Gerais .....	71
3.4.2	Objetivos específicos.....	71
3.5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.5.1	Animais, aclimatação e experimento de exposição .....	72
3.5.2	Bioacumulação do PHE nos tecidos de <i>C. brasiliiana</i> .....	72
3.5.3	Extração de RNA total e síntese de cDNA .....	73
3.5.4	Seleção de genes, desenho dos iniciadores e análises de qPCR em tempo real	74
3.5.5	Ensaio enzimático.....	75
3.5.6	Peroxidação lipídica.....	76
3.5.7	Análises estatísticas .....	77

3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.6.1	Acúmulo de PHE no tecido das ostras .....	77
3.6.2	Respostas transcricionais de biotransformação e genes antioxidantes em brânquias de <i>C. brasiliana</i> .....	79
3.6.3	Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de <i>C. brasiliana</i> .....	85
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
4	CONCLUSÕES FINAIS .....	89
	REFERÊNCIAS .....	91



## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

### 1.1 Contaminação ambiental

No Brasil, a contaminação do ambiente costeiro é decorrente, em grande parte, da ocupação desigual do território em direção a região litorânea. Além disso, a velocidade de ocupação no litoral não foi acompanhada por um plano de crescimento sustentável com medidas profiláticas de saneamento básico e exploração racional dos recursos. Em função disso, os ambientes de rios, baías, estuários, e áreas costeiras e litorâneas, têm sido muito afetados pelos contaminantes (LACERDA; MALM; MALM, 2008; MORAES, 2001). A contaminação nesses locais é caracterizada, normalmente pela habitação e urbanização, turismo e atividades portuárias, atividades que despejam constantemente substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas nessas áreas. Essas substâncias podem ainda ser lançadas diretamente nos ambientes aquáticos através do esgoto sanitário e industrial, não removidos por sistemas de tratamento de efluentes convencionais, ou indiretamente através de rios, lixiviação de solos e precipitação atmosférica (FREIRE et al., 2008; ROMANI et al., 2003).

Esse despejo de contaminantes representa um grande risco para a biota aquática e à saúde humana (MDC/MMA, 1996). A detecção de agentes químicos que podem causar danos aos recursos hídricos é feita por diversos métodos analíticos. No entanto, a identificação dessas substâncias lançadas na natureza, assim como seus metabólitos, pode representar um grande desafio, devido às inúmeras possibilidades de compostos que podem ocorrer em um mesmo local, demandando um grande esforço de trabalho e muitas vezes necessitando de equipamentos analíticos sofisticados e de alto custo (AMORIM, 2003). Além disso, a caracterização das consequências biológicas da exposição a substâncias tóxicas com base apenas em análises químicas é muito difícil, devido às suas limitações na predição de efeitos sinérgicos e antagônicos de contaminantes, em misturas ambientais complexas. Por outro lado, ensaios biológicos são capazes de caracterizar os efeitos de contaminantes ambientais causados pelas exposições

crônicas ou agudas, sem necessidade de conhecimento prévio dos componentes químicos presentes na água (BARBOSA et al., 2010; CAJARAVILLE et al., 2000).

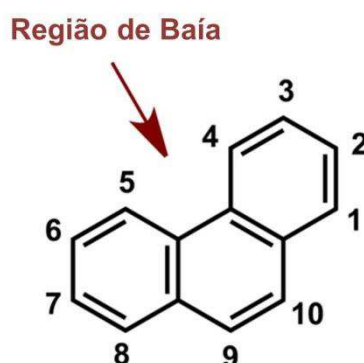
## 1.2 Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) e o Fenantreno

Durante décadas os ecossistemas costeiros têm sido alvo de um aumento da contaminação por compostos de diversas classes, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). A contaminação causada por HPA está associada a derramamentos de petróleo e seus derivados, esgotos sanitários municipais e industriais, lixiviação urbana e a deposição atmosférica (EISLER, 1987). São constituídos por uma classe de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos agrupados. Possuem como característica marcante a hidrofobicidade, que aumenta com o peso molecular (JUHASZ; NAIDU, 2000; PEREIRA NETTO et al., 2000). Devido a essa característica hidrofóbica, os HPA atravessam facilmente a membrana plasmática das células, sendo absorvidos da água e de sedimentos contaminados. São compostos amplamente distribuídos no ambiente aquático e potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (HANNAM et al., 2010; ZACCHI et al., 2017). Além disso, esta classe de contaminantes é, em geral, considerada de alta prioridade na legislação ambiental e na análise de risco ecológico de efluentes industriais (EPA, 2008). Essas características fazem com que haja uma significativa preocupação em realizar estudos que avaliem os efeitos dos HPA nos ambientes aquáticos e nos organismos que habitam esses ambientes (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

Estudos sobre a toxicidade dos HPA indicam que eles podem causar estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 1988; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Em peixes, os HPA são capazes de causar inúmeros efeitos nocivos, entre eles: mortalidades em diferentes estágios de desenvolvimento; diminuição do crescimento; edemas; disfunções cardíacas; deformidades morfológicas; danos no sistema imunológico; lesões na pele e no fígado (CHEN et al., 2017; TAYLOR; LOGAN, 2007). Dentre os HPA, o fenantreno destaca-se por estar listado entre os 16 HPA prioritários e rigorosamente controlados pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE) (CAVRET; FEIDT, 2005). O fenantreno é constituído por

três anéis benzênicos agrupados formando uma região côncava, chamada região de baía. Tal organização de átomos e carbonos confere um alto grau de reatividade bioquímica a este composto, que, apesar de não ser considerado carcinogênico, possui uma maior tendência à carcinogenicidade por apresentar essa região (Figura 1) (BAIRD, 2002).

Figura 1- Estrutura molecular do fenantreno com destaque para a região de baía.

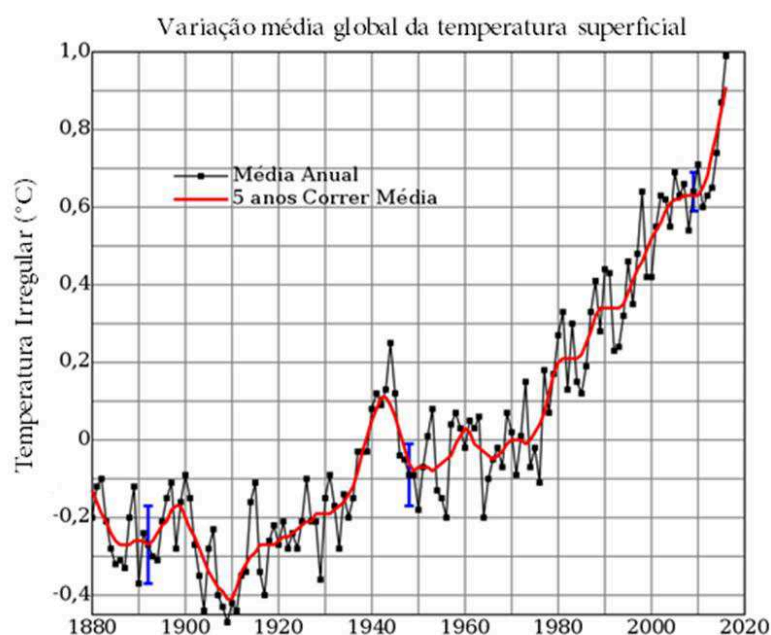


Devido a sua ampla distribuição nos ambientes aquáticos e toxicidade, os efeitos do fenantreno vêm sendo frequentemente avaliados em animais aquáticos. A exposição ao fenantreno promove danos a esses organismos, sendo os mecanismos de biotransformação e detoxificação, vitais na tentativa de minimização dos mesmos e reestabelecimento da homeostase (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004). Em moluscos, o fenantreno é capaz de induzir o estresse oxidativo, imunossupressão e genotoxicidade, além de estimular alterações moleculares em níveis transcricionais de genes de biotransformação (EINSPORN; KOEHLER, 2008; HANNAM et al., 2010; PIAZZA et al., 2016). Além disso, estudos que avaliam o efeito da interação entre o fenantreno e fatores abióticos ligados a mudanças climáticas, tais como salinidade, relataram mudanças transcricionais significativas em genes relacionados ao sistema de biotransformação de xenobióticos em moluscos bivalves (ZACCHI et al., 2017).

### 1.3 Temperatura e pH

Mudanças climáticas, como o aumento crescente da temperatura global e a acidificação dos oceanos, representam um alto risco de impacto em ecossistemas marinhos, especialmente em áreas costeiras (ATTIG et al., 2014). A temperatura média global em 2016 foi cerca de 0,99°C mais quente que a média de meados do século XX, fazendo com que 2016 seja o terceiro ano seguido a estabelecer recorde de temperatura média da superfície global (NASA, NOAA, 2017). A Figura 2 apresenta a variação média global da temperatura superficial entre os anos de 1880 a 2015.

Figura 2 - Variação média global da temperatura superficial de 1880 a 2015, em relação à média de 1951-1980. A linha preta é a média anual e a linha vermelha é a média de cinco anos de corrida.



Fonte: NASA GISS.

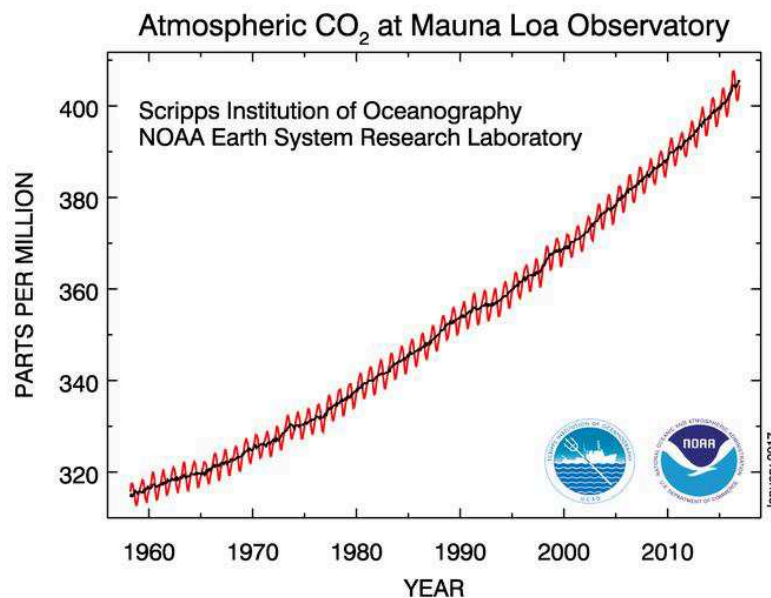
Mudanças na temperatura da água podem causar estresse sobre os organismos e efeito adversos sobre sua saúde. Esse estresse induzido pelo aumento da temperatura da água também está associado ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo (AN; CHOI, 2010; ZHANG et al., 2016). Diferenças nos parâmetros abióticos como temperatura, salinidade e pH podem tornar a identificação de respostas biológicas a substâncias

tóxicas difíceis de interpretar, uma vez que podem influenciar as características de absorção e distribuição dessas substâncias nos organismos (ALMEIDA et al., 2007; BEBIANNO; BARREIRA, 2009; DA SILVA et al., 2005).

Nos estuários, o pH pode sofrer variações diárias e sazonais dos valores típicos para o oceano aberto de 7,8 a 8,2 para pH de 6,0 a 7,0, o que pode ser prejudicial aos organismos aquáticos a longo prazo, especialmente considerando que evoluíram durante milhões de anos sob condições relativamente constantes de pH (BENIASH et al., 2010; HARDEGE et al., 2011).

Devido principalmente às atividades antropogênicas, a concentração do dióxido de carbono presente na atmosfera tem aumentado desde os níveis pré-industriais, na faixa de 172 a 300 ppm até a concentração atual de 404 ppm (Figura 4) (BRESSAN et al., 2014; NOAA, 2017). As emissões aumentaram a uma taxa de 1,0% ao ano na década de 1990 e atingiram um pico de 3,4% ao ano entre 2000 e 2008. Os oceanos absorveram aproximadamente 25% do CO<sub>2</sub> liberado pelas atividades humanas e esse valor deve aumentar para até 90% em escalas de tempo milenares. Estas quantidades crescentes de CO<sub>2</sub> dissolvido no oceano resultam na diminuição do pH e mudanças na química do carbonato de água do mar (BRESSAN et al., 2014; SABINE, 2004).

Figura 3 - Dióxido de carbono atmosférico médio mensal no Observatório Mauna Loa, Havaí. Dados medidos de dióxido de carbono (curva vermelha) como fração molar em ar seco. A curva preta representa os dados corrigidos sazonalmente. Os dados são relatados como fração molar seca definida como o número de moléculas de dióxido de carbono dividido pelo número de moléculas de ar seco multiplicado por um milhão (ppm).



Fonte: U.S. Department of Commerce/National Oceanic & Atmospheric Administration/NOAA Research.

Alterações na química da água do mar, causadas pelo aumento nos níveis de CO<sub>2</sub> e consequente diminuição de pH, podem influenciar o metabolismo de animais aquáticos. Particularmente em espécies sésseis, uma vez que não dispõem de meios de migração para áreas sem esse impacto (CHAPMAN et al., 2011; GONCALVES et al., 2016).

Recentemente estudos que levam em consideração fatores como aumento da temperatura e acidificação dos oceanos, combinados ou não com contaminantes ambientais, vem sendo realizados. Dentre eles a avaliação de enzimas envolvidas em processos de biotransformação e estresse oxidativo em diversos organismos aquáticos, como bivalves (AN; CHOI, 2010; ATTIG et al., 2014; HANNAM et al., 2010), além de estudos que visam um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares de resposta a esses estressores ambientais (CHAPMAN et al., 2011; CLARK et al., 2013; DA SILVA et al., 2005; ERTL et al., 2016; GONCALVES et al., 2016).

#### 1.4 Biomarcadores de contaminação ambiental

A fim de monitorar a presença de contaminantes ambientais, como os HPA, programas de biomonitoramento atuam no controle da qualidade ambiental por meio da análise do efeito de contaminantes na biota. A exposição de organismos aquáticos a HPA e outros contaminantes pode ser determinada pelos níveis de bioacumulação em seus tecidos; além disso, vários programas de biomonitoramento ambiental usam biomarcadores de contaminação ambiental na determinação dos efeitos biológicos em organismos aquáticos expostos a contaminantes (FLORES-NUNES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008a; PESSATTI et al., 2016; ROMÉO et al., 2003; VIARENGO et al., 2007; VIDAL-LIÑÁN et al., 2014).

Biomarcadores são definidos como alterações biológicas que ocorrem em um indivíduo quando exposto a contaminantes químicos, sendo que essas alterações podem ser em diferentes níveis de organização biológica (molecular, bioquímico e/ou fisiológico) (WALKER et al., 2012). Os biomarcadores expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes nos organismos expostos. Os biomarcadores atuam como sinalizadores da degradação ambiental causada pelos contaminantes, antecipando, assim, possíveis danos nas populações e comunidades biológicas (RAND, 1995).

Biomarcadores bioquímicos se referem, geralmente, a alterações na expressão de proteínas e na atividade de enzimas. Dentre alguns biomarcadores bioquímicos de uso frequente em estudos ambientais destacam-se a atividade de enzimas do processo de biotransformação e de enzimas antioxidantes (PEREIRA et al., 2011; ZANETTE et al., 2008).

Paralelamente à utilização de biomarcadores bioquímicos, técnicas de biologia molecular vêm sendo padronizadas e aplicadas em programas de biomonitoramento ambiental, e focam, principalmente, na expressão diferencial de transcritos e na identificação de novos genes em organismos expostos a diferentes classes de contaminantes (LÜCHMANN et al., 2015a; PESSATTI et al., 2016).

Outra categoria de biomarcadores são os biomarcadores de efeito. Como o próprio nome sugere, esses parâmetros expressam um dano causado direta ou

indiretamente pelo contaminante na célula. Por exemplo, peroxidação lipídica que pode levar a formação de hidroperóxidos de lipídeos que se decompõem e geram vários aldeídos, incluindo o malondialdeído (MDA). Esse produto da peroxidação lipídica pode ser usado como um índice do estresse oxidativo do tecido (ALMEIDA et al., 2003, 2004).

### 1.5 Enzimas do sistema de biotransformação

A habilidade dos organismos de sobreviverem em ambientes contaminados ocorre devido a uma variedade de enzimas que atuam modificando os compostos absorvidos desses ambientes e, assim, facilitando a sua eliminação do organismo. As enzimas que metabolizam esses compostos pertencem ao sistema de biotransformação (PARKINSON, 2010). Essas enzimas agem na conversão de moléculas orgânicas lipofílicas em produtos com maior hidrofiliabilidade, e que assim são mais facilmente excretadas das células. Esse processo ocorre através de uma série de reações enzimáticas, separadas em fase I e II do processo de biotransformação (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017).

A fase I do sistema de biotransformação representa a primeira linha de defesa contra substâncias tóxicas. As enzimas de fase I atuam principalmente na oxigenação de compostos lipofílicos. Essas reações são realizadas principalmente por enzimas da superfamília citocromo P450 (CYP), que apresentam atividade monooxigenase (GROVES, 2015). As enzimas dessa superfamília catalisam a hidroxilação de substratos orgânicos, incorporando aos substratos um átomo de oxigênio enquanto que outro átomo de oxigênio é reduzido a H<sub>2</sub>O. As reações de monooxigenases catalisadas por CYP requerem dois elétrons, que provém da oxidação de NADPH ou NADH. Devido a isso, CYPs são encontrados associados a enzimas redutases, como a NADPH-citocromo P450 redutase e NADH-citocromo *b5* redutase (KANDEL; LAMPE, 2014; OMURA, 2010).

Essa superfamília possui papel central na biotransformação da maioria dos xenobióticos, como drogas, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos (HPA, HA), bifenilas policloradas (BPC), entre outros (GONZALEZ, 2005). Além de participar do metabolismo de xenobióticos, a superfamília CYP atua em diversos processos-chave endógenos dos organismos, como produção de hormônios esteróides, ácidos



graxos, vitaminas e eicosanóides (GUENGERICH, 2008; GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016).

Em vertebrados, os xenobióticos são metabolizados principalmente pelas famílias CYP1, CYP2, CYP3 e CYP4 (GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016; NEBERT; DALTON, 2006). A subfamília CYP1A é responsável por metabolizar uma ampla quantidade de xenobióticos, entre eles os HPA (MCMANUS et al., 1990). Em mamíferos, a família CYP3 é responsável pela biotransformação de mais de 50% das drogas utilizadas clinicamente e muitos outros xenobióticos. A subfamília CYP2B é responsável por 20 a 30% do metabolismo de drogas e xenobióticos (WILLIAMS et al., 2004).

Apesar das enzimas de fase I não gerarem alterações significativas no peso molecular ou na hidrofobicidade das moléculas metabolizadas, seu metabolismo adiciona ou expõe regiões para a atuação das enzimas do metabolismo de fase II. Contrastando com a fase I, a fase II se caracteriza por uma etapa de conjugação e tipicamente resulta em um aumento considerável do peso molecular e da solubilidade em água do substrato metabolizado (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

O metabolismo de fase II é representado principalmente por três classes de enzimas: Sulfotransferases (SULT), Uridina difosfoglucuronosiltransferase (UDPGT), e Glutathione S-transferases (GST). Essas enzimas catalisam, respectivamente, reações de sulfatação, glucuronidação e conjugação à glutathione. Essas reações podem ocorrer diretamente no composto nativo que contenha motivos estruturais apropriados ou, como ocorre mais comumente, a partir de grupos funcionais adicionados ou expostos pela oxidação de fase I. Após a ação das enzimas de fase II, ocorre a transformação de uma molécula hidrofóbica em um produto mais hidrofílico, que, conseqüentemente, é mais facilmente excretado pela célula (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

Alguns autores incluem uma terceira fase que ocorre após o processo de biotransformação (XU; LI; KONG, 2005). Essa fase é caracterizada por proteínas que conferem resistência a multixenobióticos (MXR), e tem sido descrita em invertebrados marinhos, como as ostras. Essas proteínas de membrana atuam como

bombas envolvidas na exportação de xenobióticos para fora das células (BARD, 2000).

O interesse do uso das enzimas de biotransformação como biomarcadores em programas de biomonitoramento é devido às enzimas de biotransformação terem a expressão e atividade aumentadas em resposta à exposição de determinados contaminantes, como derivados de petróleo e bifenilas policloradas (VIARENGO et al., 2007; OSPAR, 2009).

### 1.6 Enzimas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SIES, 1985). Algumas dessas espécies são formadas naturalmente durante o metabolismo aeróbico na mitocôndria, durante a fagocitose realizada por neutrófilos e pela atividade de enzimas que utilizam oxigênio como substrato (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014). Entretanto, na presença de compostos orgânicos, como quinonas e HPA, a produção dessas espécies pode ser elevada como consequência do aumento da atividade de enzimas que biotransformam esses compostos, devido a capacidade desses xenobióticos em gerar ciclos de reações oxidativas ou reações desacopladas no citocromo P450 (AKCHA; BURGEOT; COIS, 2003; REGOLI et al., 2002; WALKER et al., 2011; PADMINI, 2010)

O aumento da produção de ERO pode levar a um quadro de estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio interno entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, que pode levar a comprometimento da sinalização e controle redox e dano em biomoléculas (SIES, 2015). Assim, estresse oxidativo ocorre quando a formação de ERO e outros oxidantes sobrepõem a capacidade antioxidante da célula.

As ERO possuem o potencial de oxidar diferentes biomoléculas, causando alterações no DNA, lesões oxidativas das membranas lipídicas e proteínas, o que pode acarretar em perda de sua estrutura e função. Um acúmulo desses danos pode, eventualmente, iniciar processos degenerativos celulares (ALMEIDA et al., 2007; CARVALHO et al., 2012; HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014). Como proteção às ERO, os organismos possuem defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas

que neutralizam/ metabolizam as ERO. Entre as defesas não enzimáticas, a mais abundante é a glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo que neutraliza diretamente diversas espécies reativas através de sua oxidação a GSSG, além de atuar como cofator de enzimas antioxidantes dependentes de glutathiona. Além disso, o tocoferol (vitamina E) e o ascorbato (vitamina C) possuem importante papel nas defesas não enzimáticas. As defesas enzimáticas incluem a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (SIES, 1985, REGOLI; GIULIANI, 2014).

As enzimas antioxidantes agem na detoxificação das ERO, gerando produtos menos reativos. O radical superóxido e o peróxido de hidrogênio representam as ERO produzidas em maior quantidade nos sistemas biológicos. O radical  $O_2^{\cdot-}$  é convertido em  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase (SOD) e este em água pelas enzimas catalase (CAT) (LEI et al., 2016) e glutathiona peroxidase (GPx), sendo que esta última também atua convertendo peróxidos orgânicos em álcoois, menos reativos (BIRBEN et al., 2012).

Além dessas, enzimas auxiliares mantêm o suprimento de substratos endógenos às enzimas antioxidantes. A glutathiona redutase (GR) reduz o GSSG a GSH, que é um co-substrato da GPx, com a concomitante oxidação de NADPH a  $NADP^+$ . Os níveis de NADPH são mantidos pela atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), da via das pentoses-fosfatos, que oxida glicose 6-fosfato a 6-fosfogliconato com a concomitante redução de  $NADP^+$  a NADPH (BIRBEN et al., 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A atividade de algumas dessas enzimas antioxidantes são propostas como biomarcadores bioquímicos de contaminação em invertebrados e são consideradas como biomarcadores nesses animais em função do estresse oxidativo gerado por muitos xenobióticos nos organismos (REGOLI et al., 2002).

### 1.7 A ostra nativa *Crassostrea brasiliana*

O cultivo de moluscos bivalves tem aumentado significativamente nas últimas décadas, principalmente no estado de Santa Catarina (EPAGRI, 2015). Contudo, tal atividade tem sido ameaçada em função da queda na qualidade da

água decorrente da gestão inadequada de águas residuais e esgotos de fontes difusas lançados no ambiente marinho.

Considerando o tamanho do Brasil existem poucos estudos de avaliação da qualidade do ecossistema marinho, tanto em zonas que sofrem o impacto das atividades antrópicas ou em áreas silvestres, e a maioria deles está relacionada a estudos de balneabilidade ou em análises específicas de compostos químicos na água (ALMEIDA et al., 2007). Bivalves são utilizados como espécies biomonitoras devido a sua capacidade de bioacumulação de contaminantes e pelo fato de serem organismos filtradores (OLIVER et al., 2001). No entanto, a quantificação dos contaminantes concentrados em seus tecidos nem sempre é suficiente para estimar o efeito desses compostos na biota aquática (ALMEIDA et al., 2007; BEBIANNO; BARREIRA, 2009).

Para avaliar os efeitos tóxicos causados pela presença dos contaminantes nos tecidos destes organismos, diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas, dentre as quais se destacam os biomarcadores (GALLOWAY et al., 2002). Através dessa ferramenta, é possível obter informações mais completas e biologicamente mais relevantes em se tratando do impacto dos xenobióticos sobre a saúde destes animais (VAN DER OOST et al., 1996).

Ostras da espécie *Crassostrea brasiliiana* (sin *Crassostrea gasar*, LAZOSKI et al., 2011) são encontradas em costões rochosos e em raízes de árvores de mangues, e sua distribuição compreende o litoral entre os estados de Santa Catarina e Pará (SIMAO DO AMARAL; SIMONE, 2014) (Figura 3). Por ser uma espécie nativa, de interesse comercial relevante e ainda apresentar a capacidade de bioacumular compostos tóxicos, *C. brasiliiana* apresenta-se como um bom organismo sentinela em estudos de monitoramento da qualidade ambiental.

Figura 4 - Foto representativa da ostra *Crassostrea brasiliana*.



Fonte: Foto cedida pela Dra. Flávia Lucena Zacchi.

Apesar de já existirem alguns estudos focados nas respostas da ostra *C. brasiliana* a xenobióticos, poucos abordaram os efeitos isolados e combinados de fatores abióticos, como temperatura e pH, na exposição a xenobióticos. Avaliar os níveis de transcritos de genes relacionados à fase I e II de biotransformação de xenobióticos, enzimas antioxidantes e danos em lipídeos em animais submetidos à essa combinação de fatores pode auxiliar na interpretação de respostas em estudos de biomonitoramento.

### 1.8 Objetivo e estrutura da tese

O presente estudo teve como objetivo:

Analisar o efeito de diferentes temperaturas e pH em brânquias de ostras *Crassostrea brasiliana* exposta ao hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno, através da avaliação dos níveis de transcritos de genes de biotransformação e de enzimas com atividade antioxidante, assim como a atividade de algumas dessas enzimas e danos em lipídios através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica.

Dessa forma, as ostras foram expostas a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fenantreno em dois experimentos distintos, sendo o primeiro para avaliar a influência da temperatura sobre as respostas das ostras frente a exposição ao fenantreno, e o segundo avaliar a interação entre o fenantreno em diferentes pH. Assim, a presente tese foi dividida em dois capítulos, sendo que:

O Capítulo 2 apresenta dados referente ao experimento de exposição das ostras a fenantreno nas temperaturas de  $18^{\circ}\text{C}$ ,  $24^{\circ}\text{C}$  e  $32^{\circ}\text{C}$ , por 24 e 96 h. Parte dos resultados desse estudo foi publicado na revista *Environmental Toxicology and Chemistry* (MÜLLER et al., 2017). Os demais resultados foram submetidos para a publicação na revista *Chemosphere*.

O Capítulo 3 foi submetido à revista *Science of the Total Environment* e apresenta os resultados da exposição de ostras *C. brasiliana* a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fenantreno em três diferentes pH (6,5; 7,0 e 8,2), por 24 e 96h.

## **2 CAPÍTULO 2**

### **EFEITOS MOLECULARES E CELULARES DA TEMPERATURA EM OSTRAS *Crassostrea brasiliiana* EXPOSTAS AO FENANTRENO.**

#### 2.1 RESUMO

A exposição de organismos aquáticos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA), como o fenantreno (PHE), pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e causar alterações nos sistemas de biotransformação. Além disso, mudanças na temperatura da água podem causar efeitos adversos nos organismos. Espécies estuarinas, como a ostra *Crassostrea brasiliiana*, podem se adaptar e tolerar variações de temperatura. Para avaliar a influência da temperatura nas respostas biológicas de *C. brasiliiana* expostas a PHE, as ostras foram mantidas em três temperaturas (18, 24 e 32°C) por 15 dias e co-expostas a 100 µg L<sup>-1</sup> de PHE por 24 e 96 h. Os níveis de PHE na água e em tecido ostra foram determinados, respectivamente, após 24 e 96 h. Além disso, o estresse térmico, biotransformação e o estresse oxidativo foram analisados em brânquias de ostras, juntamente com a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferases (GST) e níveis de peroxidação lipídica. As ostras acumularam níveis significativos de PHE. Os transcritos de *HSP70* foram afetados apenas pela exposição ao PHE a 32°C. Os níveis de transcritos das isoformas do citocromo P450 (*CYP2-like2* e *CYP2AU1*) foram regulados negativamente nas ostras expostas ao PHE por 24 h na temperatura de 32°C. Os níveis de transcritos de *GSTΩ-like* foram também regulados negativamente no grupo exposto a PHE a 32°C. Após 96 h de exposição, os transcritos de *CYP2-like2* foram maiores no grupo exposto ao PHE a 32°C. Ostras mantidas a 18°C apresentaram níveis mais elevados de transcritos de *SOD-like*, juntamente com atividades mais elevadas de GST, GPx e G6PDH, associadas a níveis mais baixos de lipoperoxidação. Em geral, as

respostas biológicas avaliadas foram mais afetadas pela temperatura do que pela coexposição ao PHE.

**Palavras-chave:** temperatura, *Crassostrea brasiliana*, fenantreno, biotransformação, estresse oxidativo



## 2.2 ABSTRACT

Exposure of aquatic organisms to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), such as phenanthrene (PHE), may increase the production of reactive oxygen species (ROS) and cause changes in the biotransformation systems. In addition, changes in water temperature can cause adverse effects in the organisms. Estuarine species, like the oyster *Crassostrea brasiliiana*, can adapt and tolerate temperature variation. To evaluate the influence of temperature on biological responses of *C. brasiliiana* exposed to PHE, oysters were maintained at three temperatures (18, 24 and 32°C) for 15 days and co-exposed afterwards to 100 µg L<sup>-1</sup> of PHE for 24 and 96 h. Levels of PHE water and in oyster tissue were determined, respectively after 24 and 96 h. In addition, thermal stress, biotransformation and oxidative stress related genes were analyzed in oyster gills, together with the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferases (GST) and levels of lipid peroxidation. Oyster accumulated significant levels of PHE. *HSP70-like* transcripts were only affected by the PHE exposure at 32°C. Transcript levels of cytochrome P450 isoforms (*CYP2-like2* and *CYP2AU1*) were down-regulated in oysters exposed to PHE for 24h at 32°C. *GSTΩ-like* transcript levels were also down-regulated in the PHE-exposed group at 32°C. After 96h, *CYP2-like2* transcripts were higher in the PHE exposed groups at 32°C. Oysters kept at 18°C showed higher levels of *SOD-like* transcripts, together with higher GST, GPx and G6PDH activities, associated to lower levels of lipoperoxidation. In general the biological responses evaluated were more affected by temperature, than by co-exposure to PHE.

**Keywords:** temperature, *Crassostrea brasiliiana*, phenanthrene, biotransformation, oxidative stress

### 2.3 INTRODUÇÃO

A emissão de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e outros gases de efeito estufa na atmosfera levam a um aumento gradual da temperatura dos oceanos (LIU et al., 2012). A estimativa é que a pressão parcial do  $\text{CO}_2$  atmosférico, em 2100 atinja a faixa entre 600 e 1000 ppm, contribuindo para um aumento estimado de até  $2^\circ\text{C}$  na temperatura da água do mar (HARNEY et al., 2016). Esse aumento de temperatura afeta diretamente o metabolismo, fisiologia e comportamento de organismos peclotérmicos, como os moluscos bivalves, alterando o seu consumo de oxigênio, taxas cardíacas, composição lipídica, expressão de proteínas de choque térmico, entre outros (ANESTIS et al., 2007; PECK; PO; HARDEWIG, 2002; PERNET et al., 2007). O estresse térmico pode promover a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo induzir nesses bivalves, um quadro de estresse oxidativo (HEISE et al., 2003; LUSHCHAK, 2011). Os efeitos deletérios desse estresse oxidativo (por exemplo, peroxidação lipídica, danos oxidativos em proteínas e DNA), podem ser minimizados por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (LUSHCHAK, 2011). O sistema antioxidante enzimático inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A CAT catalisa a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio molecular. A GPx reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros peróxidos orgânicos reativos em alcoóis menos reativos, prevenindo também o dano oxidativo (ALMEIDA et al., 2007).

O estresse oxidativo, mediado pelo estresse térmico, pode ser afetado pela exposição a contaminantes, como derivados de petróleo. Uma vez que estes compostos podem causar um aumento na produção de ERO em organismos aquáticos, devido a processos de biotransformação e aumento da demanda energética (BANNI et al., 2014; BHAGAT; SARKAR; INGOLE, 2016; HANNAM et al., 2010; LANNIG; FLORES; SOKOLOVA, 2006). Da mesma forma, a temperatura pode afetar a toxicidade de xenobióticos, uma vez que promove um aumento do metabolismo em organismos peclotérmicos. Uma elevação de temperatura pode induzir o aumento dos processos de biotransformação e excreção, levando a um

acúmulo de metabólitos reativos, causando danos celulares (EGAAS e VARANASI, 1982; ANDERSSON e KOIVUISAARI, 1985; AMUTHA E SUBRAMANIAN, 2010).

O fenantreno (PHE) é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) encontrado em derivados de petróleo e também detectado em algumas áreas de exploração de petróleo oceânico, em concentrações variando de 14 a 1460 µg/L (ANYAKORA et al., 2005; VRANA et al., 2001). Estudos posteriores demonstraram que o PHE pode alterar os níveis de transcritos e atividade de enzimas antioxidantes em bivalves (*Nodipecten nodosus*), possivelmente como uma resposta ao aumento da formação de ERO (PIAZZA et al., 2016). O PHE também gera alterações histológicas nos divertículos digestivos e no manto em ostras *Crassostrea brasiliana* (DOS REIS et al., 2015) e modula a transcrição de genes envolvidos na biotransformação de xenobióticos na mesma espécie e também em *N. nodosus*, incluindo genes da família do citocromo P450 2 (*CYP2AU1* e *CYP2-like2*), sulfotransferases (*SULT-like*) e glutationa S-transferase (*GSTΩ-like* e *GSTm-like*) (LÜCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016; ZACCHI et al., 2017).

Além do estresse oxidativo e processos de biotransformação, as respostas ao estresse térmico, expressas como alterações de proteínas de choque térmico (HSP), foram extensivamente avaliadas em espécies marinhas, especialmente em moluscos bivalves (LESSER; KRUSE, 2004). As HSP são descritas como chaperonas moleculares que redobram as proteínas desnaturadas sob estresse térmico (ANESTIS et al., 2007; IZAGIRRE et al., 2014a; LESSER; KRUSE, 2004). Alterações nos níveis de HSP também ocorrem como resposta a uma grande variedade de estressores, incluindo compostos químicos como a HPA (ANESTIS et al., 2010; IZAGIRRE et al., 2014a). No genoma de *Crassostrea gigas*, 88 cópias do gene *HSP70* foram identificadas e associadas à adaptação a condições de estresse (ZHANG et al., 2012).

Os bivalves têm sido amplamente utilizados como organismos sentinela em programas de avaliação ambiental, principalmente devido a seus hábitos de alimentação filtradora e sua natureza sésil (ALMEIDA et al., 2007; ANESTIS et al., 2007; BEBIANNO; BARREIRA, 2009; BEEBY, 2001). A ostra do mangue, *C. brasiliana* (sin. *Crassostrea gasar*, LAZOSKI et al., 2011), tem sido utilizada como

organismo sentinela na avaliação dos impactos de HPA (especialmente PHE), nas zonas costeiras brasileiras (DOS REIS et al., 2015; LÜCHMANN et al., 2011, 2014, 2015a; PESSATTI et al., 2016; ZACCHI et al., 2017). Apesar de diversos estudos serem focados nas respostas bioquímicas e moleculares de *C. brasiliiana* expostas à PHE, há uma falta de informações sobre a influência da temperatura nessas respostas.

O estudo dos efeitos da temperatura na toxicidade de HPA em ostras *C. brasiliiana* é importante para promover a melhor compreensão das respostas dessa espécie a essa classe de contaminantes, considerando variações sazonais na temperatura e também possíveis elevações na temperatura da água, devido a mudanças climáticas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura per se e o efeito da exposição ao PHE em diferentes temperaturas nos níveis de transcritos de genes envolvidos no estresse térmico, biotransformação de xenobióticos, de defesa antioxidante e marcadores de estresse oxidativo celular (atividades de enzimas antioxidantes e níveis de peroxidação lipídica), bem como a atividade da enzima de fase II, glutathione-S-transferase (GST).

## 2.4 OBJETIVOS

### 2.4.1 Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da temperatura em respostas bioquímicas e moleculares em ostras da espécie *Crassostrea brasiliana* expostas ao hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno.

### 2.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de transcritos de genes envolvidos no sistema de biotransformação, enzimas antioxidantes e estresse térmico em brânquias de ostras do mangue em três diferentes temperaturas (18°C, 24°C e 32°C) expostas ao PHE na concentração de 100 µg.L<sup>-1</sup>, após exposição por 24h e 96h;
- Analisar a atividade das enzimas catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD), em ostras expostas por 24 e 96h ao PHE na concentração de 100 µg.L<sup>-1</sup> e mantidas em três diferentes temperaturas (18°C, 24°C e 32°C);
- Avaliar o nível de peroxidação lipídica quantificado pela concentração de malondialdeído (MDA) nas brânquias de *C. brasiliana* expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de PHE nas condições citadas acima;
- Determinar os níveis de bioacumulação do fenantreno (PHE) no tecido das ostras após 96h de exposição em três diferentes temperaturas (18°C, 24°C e 32°C).

## 2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.5.1 Animais, aclimatação e experimento de exposição

Ostras adultas da espécie *C. brasiliiana* (6 – 7 cm) foram obtidas no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, (LMM/UFSC), em Florianópolis, sul do Brasil. Os animais foram divididos em três grupos e mantidos a salinidade 35, fotoperíodo 12:12 (claro:escuro), com renovação total diária de água e alimentadas uma vez ao dia com uma dieta de 50% of *Isochrysis galbana* e 50% de *Chaetoceros muelleri* –  $20 \times 10^4$  cél.ml<sup>-1</sup>. Durante o período de aclimatação, cada grupo teve sua temperatura gradualmente ajustada (0,5 – 1,5°C por dia) para 18, 24 e 32°C durante sete dias, e mantidas por mais sete dias nas temperaturas selecionadas. Após o período de aclimatação, as ostras foram divididas aleatoriamente em dois aquários de exposição de vidro para cada temperatura e 40 animais por aquário. Os aquários possuíam aeração individual, eram cobertos com tampas de vidro e mantidos dentro de caixas de plástico individuais contendo filtros de vapor orgânico para evitar a contaminação por via aérea para os grupos de controle.

O PHE foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e então adicionado aos aquários de exposição, em cada temperatura selecionada (F18, F24 e F32), a fim de atingir a concentração nominal final de 100 µg.L<sup>-1</sup>, em uma concentração final máxima de 0,002% (v/v) de DMSO. No intuito de avaliar os efeitos da temperatura na toxicidade do PHE, concentração de 100 µg.L<sup>-1</sup> de PHE foi escolhida com base em estudos anteriores com *C. brasiliiana* (LÜCHMANN et al., 2014, 2011), em que foram relatados efeitos em níveis de transcritos de genes relacionados ao sistema de biotransformação de xenobióticos. Os grupos controles, um para cada temperatura (C18, C24, C32), foram submetidos às mesmas condições dos grupos expostos, com a adição de 0,002% (v/v) de DMSO, sem o PHE. Em Santa Catarina, a temperatura varia entre 18 e 30°C ao longo do ano. Portanto, as temperaturas selecionadas escolhidas para representar condições de baixa (18°C), média (24°C) e alta temperatura (32°C). O estado de Santa Catarina é o maior produtor de ostras do Brasil, dessa forma é importante avaliar a influência dessas temperaturas máximas e mínimas para obter cenários ambientais mais realistas.

Durante 24 e 96 h de exposição, os organismos dos grupos controle e exposto não foram alimentados, a água total foi renovada e o PHE novamente adicionado diariamente. Os tempos de exposição foram escolhidos com base em estudos prévios realizados com análise molecular e enzimática em bivalves expostos a PHE. Os tempos de exposição foram escolhidos com base em estudos anteriores realizados com análise molecular e enzimática em bivalves expostos a PHE (LÜCHMANN et al., 2014, 2015; PIAZZA et al., 2016; ZACCHI et al., 2017). Antes e após 96 h de exposição ao PHE, um *pool* de dez ostras de cada aquário foi coletado para análises químicas de PHE nos tecidos dos animais. Após 24 e 96 h de exposição, dez animais de cada grupo foram dissecados e as brânquias foram removidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e então armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises subsequentes. As brânquias foram selecionadas como tecido-alvo, pois estão em contato direto com a água, é um tecido primário de bioacumulação e já foram relatadas respostas transcricionais e enzimáticas de biotransformação em brânquias de moluscos expostas a PHE (LÜCHMANN et al., 2015, 2014; PIAZZA et al., 2016, ZACCHI et al., 2017).

### 2.5.2 Monitoramento do fenantreno na água do mar

Cinco mililitros de água do mar foram coletados durante 24 h em frascos âmbar a cada 15 minutos durante a primeira hora, a cada 30 minutos até a terceira hora, e então a cada hora para as 8 h subsequentes. Uma última coleta foi realizada após 24 h, nos tanques com e sem ostras a fim de estimar a meia-vida do PHE na água. As concentrações de PHE foram determinadas por fluorescência (250 nm de excitação e 360 nm de emissão), utilizando um espectrofluorímetro Spectramax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os aquários mantidos sem ostras, em cada temperatura, foram utilizados para monitorar a taxa de depleção de PHE devido à volatilização, dissolução e/ou degradação. A concentração de PHE na água foi estimada com base em uma diluição seriada de  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHE, usada como padrão de referência. A meia-vida do PHE devido ao consumo pelas ostras e depleção foi calculada.

### 2.5.3 Bioacumulação do PHE nos tecidos de *C. brasiliensis*

Um *pool* de todos os tecidos (n=10), de cada tratamento, foram secos durante 72 horas em liofilizador (Thermo Savant – modulo D). Em seguida, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente. O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 g de sílica gel e pré-extraída cinco vezes com n-hexano e 1 g de sulfato de sódio. A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e foi adicionado os padrão interno (benzo(b)fluoranteno-d<sub>12</sub>). O volume final foi de 1 mL.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC/MS) (6890/5973N, Agilent Technologies), a coluna cromatográfica utilizada foi Agilent Technologies com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons).

A identificação dos HPAs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados através da razão massa/carga (m/z) do íon de quantificação. A quantificação foi feita por razões entre os *surrogates* e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

### 2.5.4 Biomarcadores moleculares

#### 2.5.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das brânquias (aproximadamente 100 mg) de dez indivíduos de cada um dos grupos experimentais utilizando o reagente Qiazol



(Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do RNA de cada amostra foi checada utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, observando-se as razões 260/280 nm. A transcrição reversa para a síntese de cDNA, a partir de 1 µg de RNA total, foi realizada utilizando o QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen). A quantificação do cDNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, observando-se as razões 260/280 nm, e armazenado a -20°C para as análises posteriores.

#### 2.5.4.2 Seleção de genes, desenho dos iniciadores e análises de qPCR em tempo real

A partir do transcriptoma de *C. brasiliensis* (LÜCHMANN et al., 2015a), 20 sequências foram escolhidas para análises da transcrição gênica por PCR quantitativo em tempo real, dentre eles nove genes candidatos a gene normalizador e 11 genes codificantes para enzimas do processo de biotransformação, enzimas antioxidantes, do metabolismo de lipídeos e proteínas de estresse térmico. Os pares de iniciadores (tabela 1) foram desenhados utilizando-se a ferramenta PrimerQuest e os parâmetros de qualidade analisados pela ferramenta OligoAnalyzer do site Integrated DNA Technologies (IDT - <https://www.idtdna.com/site>).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores usados para amplificação dos genes por RT-qPCR, seus respectivos nomes, amplicons e função biológica.

Nome do gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (bp)	Função biológica
<i>Catalase - CAT-like</i>	F - TAC AAC CAC ATC GAG GAC GGG AAG R - TCC TTC TGG GAC CAT ACC TTG GTG	151	Sistema antioxidante
<i>Citocromo 450 2 AU 1 - CYP2AU1</i>	F - AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC R - TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA	158	Fase I biotransformação
<i>Citocromo 450 família 2 - CYP2-like2</i>	F - CGC TTC GCA GTC CAA GTT GAC AAA R - ATC GTG TTT GGG TTC AGG TAT GCG	136	Fase I biotransformação
<i>Proteína ligante de ácido graxo - FABP-like</i>	F - ACG TGA ACG ACG ATG ACC ACA AGT R - TGG TGT TGT CCT TGG ATT TAC CGT CC	105	Proteína de transporte de ácido graxo
<i>Glutaciona peroxidase - GPx-like</i>	F - CGTTGCCCGCCATTGACCTCTATCT R - ACCAGTTTGGAAAGTCAGGAGCCAG	144	Sistema antioxidante
<i>Glutaciona S-transferase ômega - GSTΩ-like</i>	F - ATT GGC ACA CGT ACC TCG TCT GAT R - TTA ATG GGA CCG CCA GAA GGT CAT	175	Fase II biotransformação
<i>Glutaciona S-transferase microsomal - GSTm-like</i>	F - GCA TTG TCT GGT GTG GTT TGG TGT R - CCT GAG AGT ATG ATG CAG CTT GCA GA	153	Fase II biotransformação
<i>Superóxido dismutase - SOD-like</i>	F - GCT CCA GAG GAT ACT GAG AGG CAT R - CCA ATG ATG GAT TGA GGA CCA GCA	124	Sistema antioxidante
<i>Sulfotransferase 1C4 - SULT-like</i>	F - CAC CTG TTA CCT CGC CAT ACT CCA R - ACT ACC ATG TCC TTC ATC AGG TCC C	149	Fase II biotransformação
<i>Proteína de choque térmico 70 - HSP70-like</i>	F - CAC CAT AGG CAA CAG CTT CAT C R - GAC AAG GGT CAG ATC CAC GAT A	108	Chaperona
<i>Proteína de choque térmico 90 - HSP90-like</i>	F - AGACGATTCCCAGATGTACTGCTCAT R - GGTCAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTC	102	Chaperona
<b>Normalizadores</b>			
<i>β actina-like</i>	F- TTGGTGACGATGCCGTGTTCAATGG R- CAGACATCAGGGTGTTATGGTTGGTATG	122	Proteína citoesqueleto
<i>α tubulina-like</i>	F - TGA GGC CCG TGA AGA TCT TGCTGC R - ACCACCCTCCTCTTCAGCTTCACCT	91	Proteína citoesqueleto
<i>β tubulina-like</i>	F- GGGCTAAGGACACTACACAGAAGGAGC R - TGTTCCCATACCAGATCCGGTGCCA	146	Proteína citoesqueleto
<i>Ankirina-like</i>	F - CATTGGTCGTCCTATTGAACAATCTAAA R - AAGTGATAAAGGTAATTCTCACACAACC	84	Proteína citoesqueleto
<i>28S proteína ribossomal-like</i>	F - CCCGAAGCCAAACACATTCAAGTGG R - GGCTTTCCATTGCGGTCACCTTAG	131	Proteína ribossomal
<i>40S proteína ribossomal subunidade s3-like</i>	F - CCTGTTATGGAGTGCTACGGTTTATC R - CATTGACTTGGCTCTCTGTCTC	78	Proteína ribossomal

<i>40S proteína ribossomal subunidade s9-like</i>	F - CCTGTTCCCTTCTTGGCATTCTT R - TGACTTCTCCCTCAGATCACCATAC	98	Proteína ribossomal
<i>Elongation factor 1-<math>\alpha</math> like</i>	F - ATTGACCAGAGAACCATCGCCAAGT R - ACGCTCAGCCTTGAGTTTGTCCAATA	102	Síntese proteína
<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase-like</i>	F - CAGTCCTTGTTACTGGGTCCATCTAC R - TGTCTAGCTCCTCTTGCGAAAGTTATTC	122	Via glicolítica

O nível de transcritos dos genes foi medido através de reações de PCR em tempo real utilizando QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). As reações de amplificação foram realizadas com 100 ng de cDNA e 1  $\mu$ M de cada iniciador, utilizando termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen) e o seguinte programa: 5 min a 60°C, 40 ciclos de 10s a 95°C e 30s a 60°C, de acordo com instruções do fabricante. O produto de PCR foi submetido à análise da curva de *melting* (temperatura de 55° a 95°C). No intuito de confirmar a ausência de produtos não específicos e dímeros de iniciadores, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%. A eficiência da reação de PCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores através de uma curva de calibração de diluição seriada com cinco concentrações. Todas as curvas apresentaram  $r^2$  superior a 0,98 e E entre 95% e 105%. O método  $2^{-Cq}$  foi utilizado para selecionar os genes normalizadores (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A fim de assegurar uma normalização mais robusta de cada gene de interesse, nove genes normalizadores foram testados (Tabela 1), e somente dois (*TUB-like* e *EF-like*) não apresentaram diferenças em seu nível de transcritos após 24 e 96 h (dados não mostrados). A média geométrica dos dois genes normalizadores foi utilizada e, por fim, todos os dados foram calibrados pela média do grupo controle de 24°C.

## 2.5.5 Biomarcadores bioquímicos

### 2.5.5.1 Preparo das amostras e ensaios enzimáticos

Aproximadamente 150 mg de brânquias de cada indivíduo foram homogeneizadas em tampão TRIS 50 mM pH 7,6 (contendo EDTA 1 mM, sacarose

0,5 M, KCl 0,15 M, DTT 1 mM, PMSF 0,1 M) na proporção 1:5 (m/v). O homogeneizado foi então centrifugado a 9.000 x g por 30 minutos a 4°C e as análises de atividade enzimática foram realizadas na fração sobrenadante.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada segundo Aebi (1984), através da reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, monitorando o decréscimo da absorbância em 240 nm, a 25°C. A determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST) foi realizada segundo descrito por Keen e colaboradores (1976), onde a velocidade de formação do conjugado glutathione com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno foi monitorada a 340 nm por 2 minutos. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi medida através do monitoramento da taxa de oxidação de NADPH a 340 nm, utilizando hidroperóxido de cumeno (CuOOH) (WENDEL, 1981). Da mesma forma, a glutathione redutase (GR) teve sua atividade determinada pelo decréscimo da absorbância em 340 nm, promovido pela oxidação de NADPH durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade da superóxido dismutase citosólica cobre/zinco (SOD) foi determinada através da inibição do citocromo c na presença de um sistema de geração de superóxido (xantina/xantina oxidase) no comprimento de onda de 550 nm (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase foi determinada pelo aumento da absorbância em 340 nm, causado pela redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH, na presença de glicose-6-fosfato (GLOCK; MCLEAN, 1953).

Os níveis de proteínas totais foram quantificados de acordo com metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todas as análises de atividade enzimática e quantificação de proteínas foram realizadas em leitor de microplacas Spectramax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### 2.5.5.2 Análise dos níveis de peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica em brânquias foram avaliados pela quantificação do produto formado pela reação de malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA). Para esta análise, 100 mg de brânquias foram homogeneizadas em 0,3 mL de tampão Tris 0,1 M (pH 8,0). Em seguida, 40 mg de TBA foram

dissolvidos em 10 mL de 0,2 M HCl e 0,3 mL desta solução foi adicionada a cada amostra. Essa mistura foi então aquecida a 90°C por 40 min. Em seguida, foi adicionado 1 ml de n-butanol e as amostras foram centrifugadas a 5.000xg por 3 min, a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada e injetada em HPLC e monitoradas a 533 nm. O sistema utilizado foi HPLC CBM-20A composto por duas bombas (Nexera XR LC-20AD XR), com amostrador automático (Nexera XR SIL-20AC XR) e a fase móvel utilizada foi tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol, fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna utilizada foi uma LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva de calibração utilizando como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano (TMP) (ALMEIDA et al., 2003, 2004).

#### 2.5.6 Análise estatística

Todos os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de verificação de *outliers* (teste de Grubbs), normalidade e homocedasticidade foram verificadas utilizando testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando necessários, os dados foram normalizados utilizando transformação logarítmica, função inversa ou raiz quadrada.

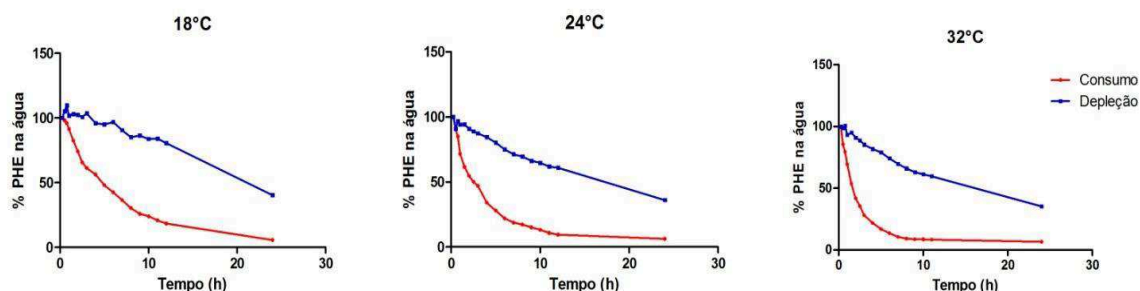
Para avaliar os efeitos da temperatura e do PHE, assim como a interação entre os dois fatores sobre os parâmetros analisados, foi aplicado o teste da análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para avaliar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Statistica 7.0<sup>®</sup> e GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.01.

## 2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.6.1 Concentração do PHE na água do mar e no tecido de ostras

A concentração e a meia-vida do PHE na água dos aquários com e sem ostras, mantidas em diferentes temperaturas foram determinadas (Tabela 2). Após 24 h, nos aquários sem ostras, a concentração de PHE na água do mar mantida a 18, 24 e 32°C foi respectivamente, 38,0, 35,7 e 33,9% da concentração inicial. Aquários contendo ostras apresentaram 5,1, 4,9 e 4,3% da concentração nominal inicial, a 18, 24 e 32°C, respectivamente, após 24h de exposição (Figura 5).

Figura 5 - Consumo por ostras *C. brasiliiana* (vermelho) e depleção em aquários sem ostras (azul) do fenantreno monitorados por fluorimetria durante 24 h de experimento.



Esses resultados indicam que as ostras foram capazes de acumular PHE a partir da água, e que uma parte do PHE é perdida da água devido à degradação, volatilização ou outro mecanismo não identificado ao longo do período experimental. O tempo de meia-vida do PHE em aquários sem ostras foi de 22,5, 16,4 e 15,3 h, a 18, 24 e 32°C, respectivamente. Nos aquários contendo ostras, a meia vida do PHE foi de 5,0, 2,1 e 1,7 h, a 18, 24 e 32°C, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração e meia vida do PHE em aquários com e sem ostras, nas temperaturas de 18, 24 e 32°C.

Temperatura	Aquário	Concentração* ( $\mu\text{g/L}$ )	Meia vida (h)
18 °C	Sem ostras	inicial: 78,7 final: 29,9	22,5
	Com ostras	inicial: 97,6 final: 5,0	4,9
24 °C	Sem ostras	inicial: 77,8 final: 27,8	16,3
	Com ostras	inicial: 95,7 final: 4,6	2,1
32 °C	Sem ostras	inicial: 80,5 final: 27,3	15,3
	Com ostras	inicial: 103,9 final: 4,6	1,7

\* A concentração foi estimada com base em uma diluição seriada de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de PHE como curva de referência.

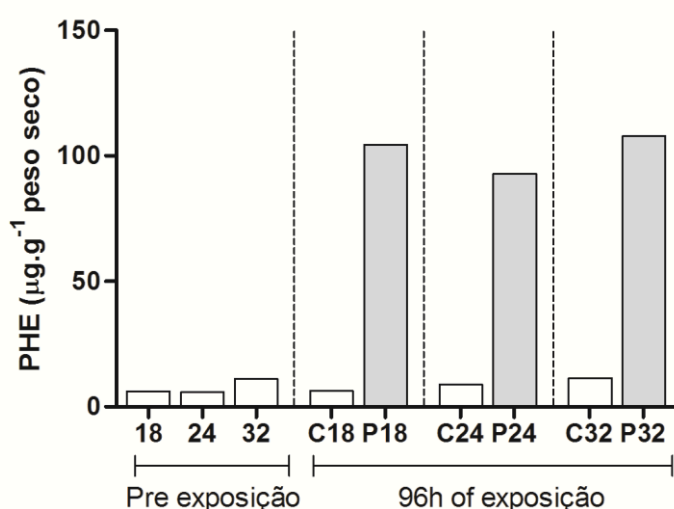
A regressão linear com dados das três primeiras horas de exposição, comparando aquários com e sem ostras, mostrou diferenças significativas entre a inclinação da reta de todas as temperaturas (Tabela 3). Adicionalmente, a regressão linear mostrou que a taxa de absorção do PHE, em aquários com ostras, foi maior em 32°C comparado a temperatura de 18°C ( $p < 0,05$ ). Esses resultados estão possivelmente associados ao aumento da taxa metabólica observada em moluscos bivalves mantidos em temperaturas mais altas, que induzem um aumento na taxa de filtração e, conseqüentemente, aumentam a absorção de PHE (BOUGRIER et al., 1995; HAURE et al., 1998; XIAO et al., 2014).

Tabela 3 - Diferenças de inclinação da reta obtidas por regressão linear durante as três primeiras horas de exposição, em aquários com e sem ostras nas temperaturas de 18, 24 e 32°C.

Temperatura	Comparação	F	p
18 °C	com x sem ostras	63,315	<0,0001
24 °C	com x sem ostras	45,153	0,00015
32 °C	com x sem ostras	109,353	<0,0001

Os níveis de PHE nas ostras controle mantidas em diferentes temperaturas foram similares ( $\sim 6 \mu\text{g.g peso seco}^{-1}$  em 18°C e 24°C e  $\sim 11 \mu\text{g.g peso seco}^{-1}$  em 32°C). Em acordo com os resultados de depleção de PHE na água, os níveis desse contaminante nos tecidos de ostras expostas a PHE foram maiores que os grupos controle (104,4, 92,7 e 108,0  $\text{peso seco}^{-1}$ , respectivamente para 18, 24 e 32°C), apesar de serem semelhantes entre grupos mantidos nas diferentes temperaturas. Curiosamente, o tempo de meia vida do PHE aparentemente menor, observado em aquários mantidos a 32°C, não refletiu em uma maior bioconcentração de PHE em tecidos de ostras, após 96h de exposição (Figura 6).

Figura 6 - Níveis de fenantreno ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em peso seco, detectados em todo o tecido das ostras nos grupos controle e expostos, antes da exposição e após 96 h de experimento.



Esses resultados podem estar relacionados aos níveis de PHE nos tecidos, uma vez que a concentração de PHE na água foi restaurada a cada 24 h. É plausível supor que após quatro etapas de reposição de PHE na água (96 h), houve

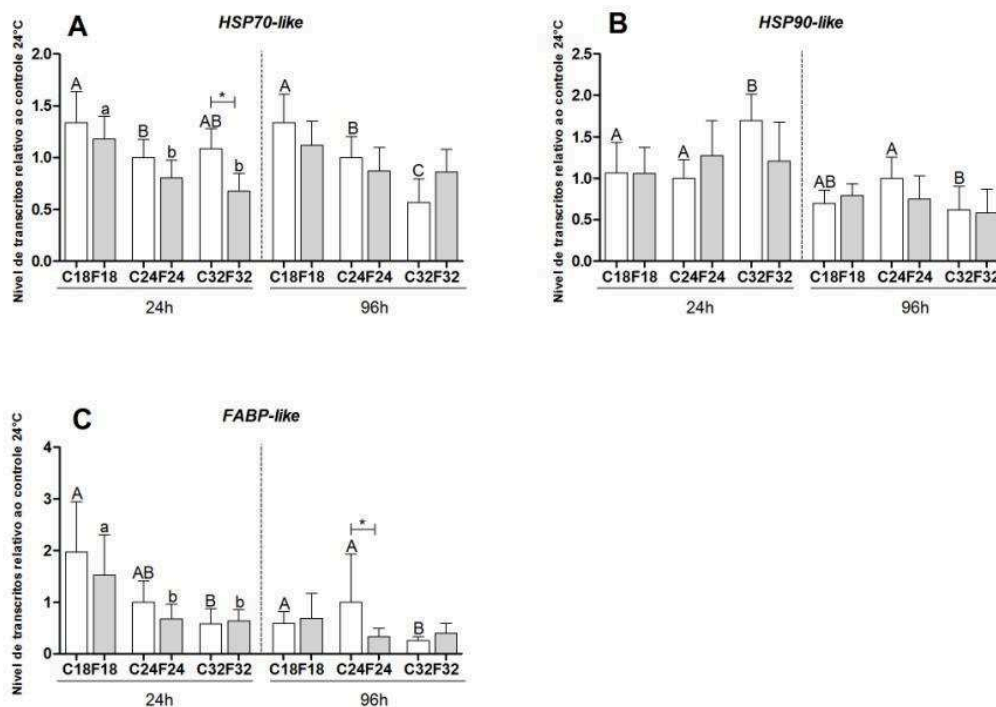


saturação dos níveis de PHE nos tecidos das ostras mantidas nas três temperaturas testadas. Resultado semelhante foi observado em um trabalho anterior, realizado com *C. brasiliiana* exposta a 100 µg.L<sup>-1</sup> de PHE, por 96 h em diferentes salinidades (35, 25 e 10 ppt) (ZACCHI et al., 2017). A bioacumulação de HPA em bivalves é esperada, uma vez que são organismos sésseis e filtradores e continuamente expostos a esses compostos na água (LIU et al., 2004), e apresentam uma capacidade limitada para metabolizar alguns HPA (SIEBERT et al., 2017).

#### 2.6.2 Respostas transcricionais de genes relacionados ao estresse térmico e metabolismo lipídico em brânquias de *C. brasiliiana*

Em ambientes aquáticos o estresse causado pela temperatura pode constituir uma perturbação fisiológica em organismos aquáticos, o que potencialmente afeta seu metabolismo (KAMEL et al., 2012), o que pode torná-los mais sensíveis à exposição a xenobióticos. Por outro lado, a exposição a xenobióticos pode afetar a capacidade do organismo de lidar com o estresse térmico (BANNI et al., 2015). A expressão de proteínas de choque térmico estão envolvidas em situações envolvendo estresse sistêmico, celular e térmico (ZHANG et al., 2016). Nesse contexto, os níveis de transcritos dos genes relacionados ao estresse *HSP70-like* e *HSP90-like* foram analisados em brânquias de *C. brasiliiana* (Figura 7A-B). O gene *FABP-like*, associado ao metabolismo de lipídeos, também foi avaliado nesse estudo (Figura 7C), uma vez que em brânquias de ostras *C. gigas* foi observado um aumento em seu nível de transcritos após a exposição a esgoto sanitário (FLORES-NUNES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008b, 2008a) e ibuprofeno (SERRANO et al., 2015), sendo então proposto como biomarcador molecular de exposição a contaminantes.

Figura 7 - Níveis de transcritos relativos dos genes (A) *Proteína de choque térmico 70-like (HSP70-like)*, (B) *Proteína de choque térmico 90-like (HSP90-like)* e (C) *Fatty acid binding protein-like (FABP-like)* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* ( $n=10$ ) expostas a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fenantreno, em três diferentes temperaturas ( $18^\circ\text{C}$ ,  $24^\circ\text{C}$  e  $32^\circ\text{C}$ ) por 24h e 96h. O nível de transcrição gênica foi avaliada por qRT-PCR e relativizados pelo controle de  $24^\circ\text{C}$ . “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto ( $p<0,05$ ).



As proteínas HSP70 foram extensivamente estudadas em ostras e apresentam grande importância na adaptação de *C. gigas* ao estresse induzido pela temperatura (ZHANG et al., 2016). Como revisado por Fabbri (2008), as HSP70s estão entre as moléculas mais estudadas em ostras e podem ser centrais no desenvolvimento de estratégias de adaptação de bivalves ao estresse de temperatura. Uma vez que a maioria dos estudos com bivalves, tanto em ambiente natural ou em condições de laboratório, apresentou como resposta um aumento na expressão de HSP70 em resposta ao estresse térmico. No presente estudo, o nível de transcritos de *HSP70-like*, em *C. brasiliana*, foram inversamente relacionados à temperatura após 24 h de exposição. Ostras mantidas na temperatura de  $18^\circ\text{C}$  apresentaram níveis de transcrição foram 1,3 vezes maiores que o grupo mantido a  $24^\circ\text{C}$  ( $p<0,05$ ), enquanto que ostras mantidas a  $32^\circ\text{C}$  não apresentaram diferenças significativas comparadas ao grupo mantido a  $24^\circ\text{C}$  ( $p>0,05$ ). Nas ostras expostas

ao PHE, o padrão foi semelhante, mas com maior decréscimo nos níveis de transcritos, apesar de não significativo. Após 24 h a 18°C, os níveis de *HSP70-like* foram maiores quando comparados aos grupos aclimatados a 24°C (1,5 vezes) e 32°C (1,7 vezes) (Figura 7A).

Diferenças no nível de transcritos de *HSP70-like* entre os grupos controle e expostos ao PHE foram observadas apenas nas ostras mantidas a 32°C após 24 h, sendo menores no grupo exposto ao PHE (Figura 7A). Após 96 h de exposição, similarmente ao observado em 24 h, os níveis de transcritos de *HSP70-like* nas ostras diminuíram inversamente à temperatura no grupo controle, indicando um possível efeito antagônico entre o aumento da temperatura e a coexposição à PHE ( $p < 0,05$ ;  $F = 6,947$ ). Similarmente, em glândula digestiva de mexilhões *M. galloprovincialis* expostos por 24 h a 18 e 26°C, na ausência e na presença de cádmio (50 µg/L), não foi observada indução de *HSP70* (IZAGIRRE et al., 2014a). Nessa mesma espécie de mexilhão, após exposição ao estresse térmico (16, 20 e 24°C) e cobre (40 µg/L), os níveis de transcritos de *HSP70* diminuíram em mexilhões expostos a 20 e 24°C, quando comparados a organismos mantidos a 16°C (NEGRI et al., 2013). O estresse pelo frio é geralmente menos problemático do que o estresse térmico, mas a regulação positiva de chaperonas moleculares, como as HSP, também pode ser necessária no estresse causado por temperaturas baixas, para evitar a desestabilização de proteínas (LESSER; KRUSE, 2004). Além disso, e ausência de um aumento esperado nos transcritos de *HSP70* pode ser devido ao tempo que as ostras foram mantidas em suas respectivas temperaturas. É importante considerar que os animais foram aclimatados por sete dias às diferentes temperaturas antes de iniciar a exposição. Portanto, é possível que mudanças em *HSP70* associadas à temperatura tenham ocorrido nesse período inicial de aclimação.

Embora aumentos na expressão de *HSP70* sejam comumente observados em bivalves expostos ao estresse térmico (FABBRI; VALBONESI; FRANZELLITTI, 2008), possivelmente levando a uma proteção celular contra proteínas degradadas, o papel destas *HSP70* em tais respostas não é totalmente compreendido em bivalves marinhos. Como trata-se de uma proteína altamente conservada em

animais, é possível supor que HSP70 em bivalves apresente funções semelhantes aos mamíferos. Proteínas HSP70 em mamíferos são necessárias para a degradação dependente de ubiquitina, de proteínas de vida curta e anormais e a inibição de HSP90 conduz uniformemente à degradação proteasomal de proteínas. Pratt e colaboradores (2011) propuseram que a HSP90 estabiliza proteínas desdobradas prevenindo a ubiquitinação dependente de HSP70. Uma vez que proteínas HSP90 podem interagir para estabilizar as proteínas, elas irão prevenir um efeito prejudicial. Quando há um grande dano e a HSP90 não pode mais interagir, ocorre a ubiquitinação dependente da HSP70, levando à degradação proteolítica. Portanto, o rápido aumento na HSP70 observado após estresse térmico agudo na maioria das espécies de bivalves pode ser uma resposta ao aumento de proteínas desdobradas ou oxidadas, a fim de aumentar sua eliminação da célula, evitando consequências deletérias, como agregação (como revisado por Fabbri, 2008). Portanto, é possível supor que a diminuição nos transcritos de *HSP70* nas ostras em elevadas temperaturas seria uma resposta compensatória para evitar a ubiquitinação excessiva de proteínas, após estresse térmico prolongado, à medida que o organismo se adapta a ele, e que a exposição ao PHE afeta essa resposta. No entanto, esta hipótese e os mecanismos envolvidos ainda precisam ser investigados.

Em acordo com essa hipótese, um padrão de transcrição diferente foi observado no gene *HSP90-like* nas ostras dos grupos controle, analisadas após 24 h de exposição (Figura 7B). Níveis de *HSP90-like* mais elevados foram encontrados em ostras mantidas a 32°C, em comparação com os grupos mantidos a 18°C (1,6 vezes) e 24°C (1,7 vezes) (Figura 7B). Esse resultado sugere o desencadeamento de um mecanismo de proteção contra a degradação proteica nas células. A regulação positiva de *HSP90* também foi relatada em mexilhões expostos a estresse térmico agudo (16, 20 e 24°C) (NEGRI et al., 2013). No entanto, não foram encontradas alterações significativas nas ostras expostas ao PHE por 24 h, nas diferentes temperaturas, quando comparadas ao grupo controle, indicando um efeito antagônico entre esses dois estressores (Figura 7B). Após 96 h de exposição, os níveis de transcritos de *HSP90-like* em brânquias de ostras mantidas a 24°C foram 1,6 vezes maiores do que àquelas mantidas a 32°C, mas não foi encontrada diferença com ostras mantidas a 18°C (Figura 7B). Após 24 ou 96 h de exposição, não foi observado diferenças estatísticas entre o grupo controle e exposto ao PHE

em todas as temperaturas testadas, indicando um efeito antagonista entre os dois estressores, e sugerindo que a exposição ao PHE influencia as respostas de *HSP90* nas ostras mantidas em temperaturas mais elevadas.

Proteínas de ligação a ácidos graxos (FABP) são proteínas citosólicas que pertencem a uma família de proteínas de ligação a lipídios intracelulares. Nos vertebrados, a FABP está envolvida em vias de energia, crescimento e desenvolvimento, e transporte de ácidos graxos entre as membranas. Algumas FABPs também estão envolvidas na regulação da expressão gênica e são mediadoras da absorção e biotransformação de xenobióticos (ESTEVEZ; EHRLICH, 2006; MEDEIROS et al., 2008a; PIAZZA et al., 2016). Após 24 h de exposição, os níveis transcritos de *FABP-like* nos grupos controle exposto ao PHE foram maiores em ostras mantidas a 18°C, quando comparadas aos organismos que permaneceram, respectivamente, a 24 e 32°C, indicando um aditivo efeito de ambos os estressores ( $p > 0,05$ ;  $F=1,439$ ) (Figura 7C). Após 96 h de exposição, o nível de transcrito de *FABP-like* nas ostras mantidas a 32°C foram menores que nos animais mantidos a 18°C (2,3 vezes) e a 24°C (3,9 vezes). Em organismos homeotérmicos, Yamamoto e colaboradores (2011) observaram uma regulação positiva da isoforma FABP3 no tecido adiposo marrom de ratos expostos a temperatura de 4°C por 48 horas. Os autores sugeriram que isso poderia contribuir para um eficiente fornecimento de ácidos graxos como substratos energéticos para mitocôndrias, que facilitam a termogênese ao desacoplar proteínas. No entanto, ostras são organismos pecilotérmicos e o papel de níveis elevados de *FABP-like* em ostras mantidas a temperaturas mais baixas, ainda precisa ser esclarecido.

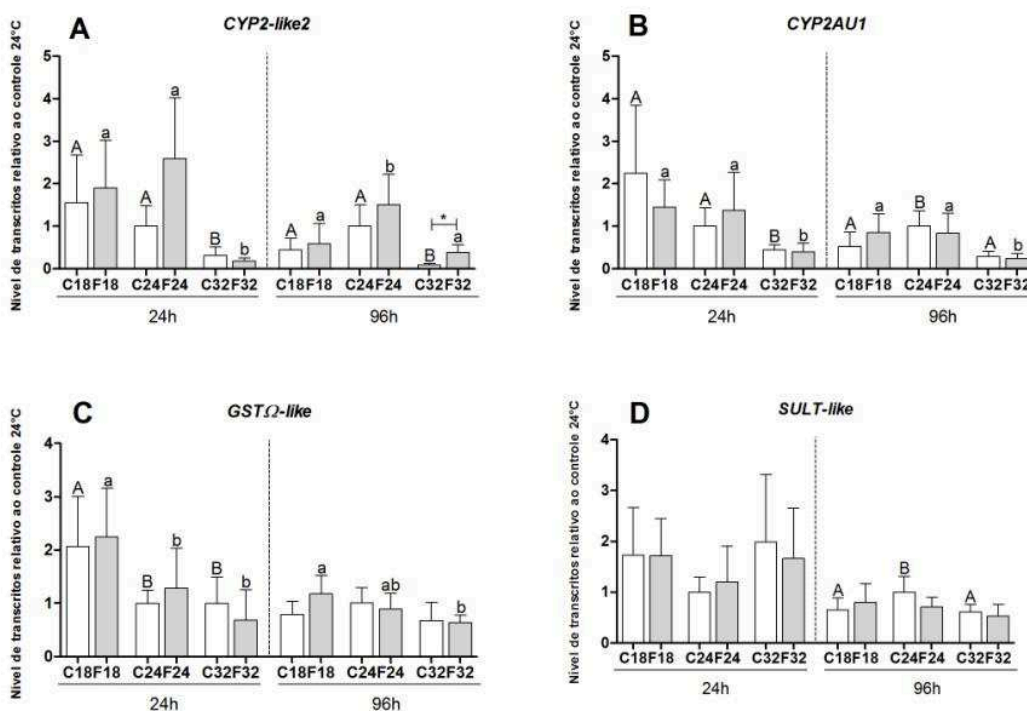
Níveis significativamente mais baixos de transcritos de *FABP-like* em ostras expostas ao PHE, foram observados apenas nos animais expostos por 96 h na temperatura de 24°C ( $p < 0,05$ ) (Figura 7C). A diminuição nos níveis de transcritos de *FABP-like* também foi observada em peixes expostos a 50 µg.L<sup>-1</sup> de pireno (BAIN, 2002). Bain (2002) sugere que, em concentrações mais altas, o pireno se assemelha suficientemente ao colesterol para se ligar a *FABP-like* e, através de uma inibição por *feedback*, reprimir sua transcrição. A isoforma quantificada neste estudo possui 84% de homologia com *CgiLBP4.2* de *C. gigas*, segundo Toledo-Silva e

colaboradores (2017). A isoforma *CgiLBP4.2* é altamente expressa nos palpos labiais e brânquias de *C. gigas* e sugere-se que o seu produto gênico poderia ligar-se a xenobióticos lipofílicos, absorvidos pelas brânquias, e desencadear sinais intracelulares que levam à transcrição de genes de biotransformação (TOLEDO-SILVA et al., 2017). De fato, o gene *CgiLBP4.2* foi regulado positivamente em ostras expostas a esgoto sanitário (FLORES-NUNES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008b, 2008a) e ibuprofeno (SERRANO et al., 2015). No entanto, esses resultados diferem da diminuição do nível de transcritos de *FABP-like* em *C. brasiliana* expostas a PHE, sugerindo um efeito antagônico com a temperatura de 24°C. Em resumo, mais estudos são necessários para melhor identificar o papel biológico da *FABP-like* no metabolismo de *C. brasiliana*.

### 2.6.3 Respostas transcricionais de biotransformação em brânquias de *C. brasiliana*

Níveis de transcritos de genes de fase I de biotransformação (*CYP2-like2* e *CYP2AU1*) e fase II (*GST $\Omega$ -like* e *SULT-like*) em brânquias ostras mantidas em diferentes temperaturas e combinadas com exposição ao PHE são apresentados na Figura 8. As famílias do CYP 1-3 estão associadas ao metabolismo de xenobióticos em vertebrados, mas sua distribuição e função em invertebrados ainda são desconhecidas (GUENGERICH, 2008; ZANETTE et al., 2009). Estudos anteriores mostraram a indução de genes *CYP2-like* em ostras (LÜCHMANN et al., 2014; ZACCHI et al., 2017) e vieras (PIAZZA et al., 2016) expostas ao PHE sugerindo que a família *CYP2* pode estar envolvida na biotransformação desse HPA.

Figura 8 - Níveis de transcritos relativos dos genes (A) *Citocromo P450 família 2-like (CYP2-like2)* (B) *Citocromo P450 2AU1 (CYP2AU1)*, (C) *Glutathiona S-transferase ômega-like (GSTΩ-like)* e (D) *Sulfotransferase-like (SULT-like)* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 µg.L-1 de fenantreno, em três diferentes temperaturas. O nível de transcrição gênica foi avaliado por qRT-PCR e relativizados pelo controle de 24°C. “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto numa mesma temperatura ( $p < 0,05$ ).



Após 24 h de exposição, os grupos controle e expostos ao PHE, mantidos a 32°C, apresentaram menores níveis de transcritos dos genes de fase I de biotransformação *CYP2-like2* e *CYP2AU1*, quando comparados com ostras mantidas a 18 e 24°C (Figura 8A-B). Níveis de transcritos de *GSTΩ-like* foram significativamente maiores em ostras mantidas a 18°C, comparadas às ostras mantidas nas outras temperaturas (Figura 8C). Transcritos de *SULT-like* não foram alterados entre os grupos após 24 h de exposição. Após 96 h de exposição, algumas dessas respostas transcricionais sofreram alterações. Os níveis dos transcritos de *CYP2-like2* e *CYP2AU1* foram maiores nos grupos controle e expostos ao PHE, mantidos a 24°C, quando comparados às ostras mantidas a 32°C (Figura 8A-B). Os transcritos de *GSTΩ-like* foram menores no grupo exposto ao PHE mantido a 32°C

(Figura 8C). Similarmente ao gene *CYP2AU1*, o nível de transcritos de *SULT-like* foram maiores nas ostras controle mantidas a 24°C, quando comparados aos outros grupos (Figura 8D). Entre os genes analisados, o PHE apenas induziu o aumento nos níveis de transcritos de *CYP2-like2* nas ostras mantidas a 32°C por 96 h (Fig. 2A). Dessa forma, sugere-se que o aumento nos níveis de transcritos de *CYP2-like2* em ostras expostas ao PHE, comparado ao grupo controle mantido a 32°C, foi devido a uma interação da exposição ao PHE na regulação negativa deste gene ( $p < 0,05$ ,  $F = 6,417$ ). Essa hipótese ainda precisa ser esclarecida. Em estudos anteriores, ostras da espécie *C. brasiliana* expostas à mesma concentração de PHE apresentaram aumento no nível de transcritos do gene *CYP2-like2* após 24 h (LÜCHMANN et al., 2014), e após 96 h de exposição a 15°C, mesmo em condição hiposmótica (10 ppt) (ZACCHI et al., 2017).

No presente estudo, apesar de não serem ativados pela exposição ao PHE nas condições experimentais testadas, os níveis de transcritos de *CYP2AU1* em brânquias de *C. brasiliana* sofreram efeito da temperatura. Altas temperaturas modulam negativamente os níveis de transcrição de *CYP2AU1* nas brânquias de ostras, mas sua transcrição não foi afetada nas ostras expostas ao PHE. Lüchmann e colaboradores (2014) também não observaram aumento do *CYP2AU1* em ostras da espécie *C. brasiliana*, expostas ao PHE (100 µg.L<sup>-1</sup>), mas um aumento nos níveis de transcrição de *CYP2AU1* foi observado em ostras expostas a 1.000 µg.L<sup>-1</sup>. Por outro lado, em baixa salinidade (10 ppt), esta mesma espécie apresentou aumento no nível de transcritos de *CYP2AU1* após 24 h de exposição a 100 µg.L<sup>-1</sup> de PHE (ZACCHI et al., 2017). Dos Reis e colaboradores (2016), utilizando a técnica de hibridização *in situ*, observaram alto nível de transcritos de *CYP2AU1* em brânquias, manto e intestino de ostras expostas a 100 e 1000 µg.L<sup>-1</sup> de PHE por 1, 5 e 10 dias de exposição. Além disso, o nível de transcritos mais altos dos genes *CYP2-like2* e *CYP2AU1* observados nos grupos expostos a PHE em 18 e 24 °C, comparados ao grupo mantido a 32 °C pode indicar uma maior taxa de biotransformação de PHE nesses grupos. O que pode explicar a concentração ligeiramente menor de PHE observada em tecidos de ostras em 18 e 24 °C nos grupos expostos a PHE (Figura 6).

Dada a relevância das GSTs nas reações de conjugação da fase II dos HPA, é importante investigar se e como a temperatura afeta a transcrição desses genes



em ostras expostas ao PHE. Os níveis de transcritos de *GST $\Omega$ -like* diminuíram com o aumento da temperatura após 24 h, sendo 2 vezes maior nas ostras mantidas a 18°C do que em ostras mantidas a 24 e 32°C (Figura 8C). Nas ostras coexpostas ao PHE, o mesmo ocorreu após 24 horas de exposição. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as ostras dos grupos controle e exposto ao PHE, em todas as temperaturas nos dois períodos experimentais (Figura 8C). A ausência de respostas na indução no nível de transcritos de *GST $\Omega$ -like* em brânquias de *C. brasiliensis*, expostas a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de PHE, foi relatada anteriormente pelo nosso grupo (LÜCHMANN et al., 2014; ZACCHI et al., 2017).

Após 96 h, os níveis de transcritos de *GST $\Omega$ -like* foram 1,8 vezes maiores nas ostras coexpostas à PHE em 18°C em comparação com aquelas coexpostas à PHE a 32°C (Figura 8C), mas nenhum efeito foi observado nas ostras controle. Foi observada interação ( $p < 0,05$ ,  $F = 4,239$ ) após 96 h de exposição à PHE, sugerindo que o efeito combinado da temperatura e do PHE foi responsável pelos maiores níveis de transcritos de *GST $\Omega$ -like* nas ostras expostas à PHE a 18°C em comparação com 32°C. Similarmente, a atividade de GST também diminuiu em animais expostos ao PHE, como o aumento da temperatura, após 96 h de exposição (Figura 10A), o que pode estar associado a níveis mais baixos de transcritos de *GST $\Omega$ -like*. As temperaturas mais altas parecem ter um efeito na diminuição dos níveis de transcrição de GST (BANNI et al., 2015; IZAGIRRE et al., 2014b) e atividade enzimática de GST (ATTIG et al., 2014; BANNI et al., 2014) em moluscos bivalves, indicando que aumento da temperatura pode prejudicar a capacidade metabólica de fase II em ostras.

Com relação a *GSTM-like*, não foram observadas diferenças entre os grupos em nenhuma das condições testadas, sugerindo que a transcrição desta isoforma não é sensível à temperatura e que esta enzima provavelmente não está envolvida no metabolismo de PHE (dados não apresentados). O nível de transcritos da *SULT-like*, em ostras mantidas a 24 °C foi maior quando comparados aos grupos de 18 °C (1,5 vezes) e 32 °C (1,9 vezes), após 96 h de exposição (Figura 8D). Esse efeito foi não observado em ostras expostas ao PHE, sugerindo que a exposição a PHE apesar de não causar a indução de *SULT-like*, foi capaz de interferir na modulação

deste gene em resposta à variação de temperatura.

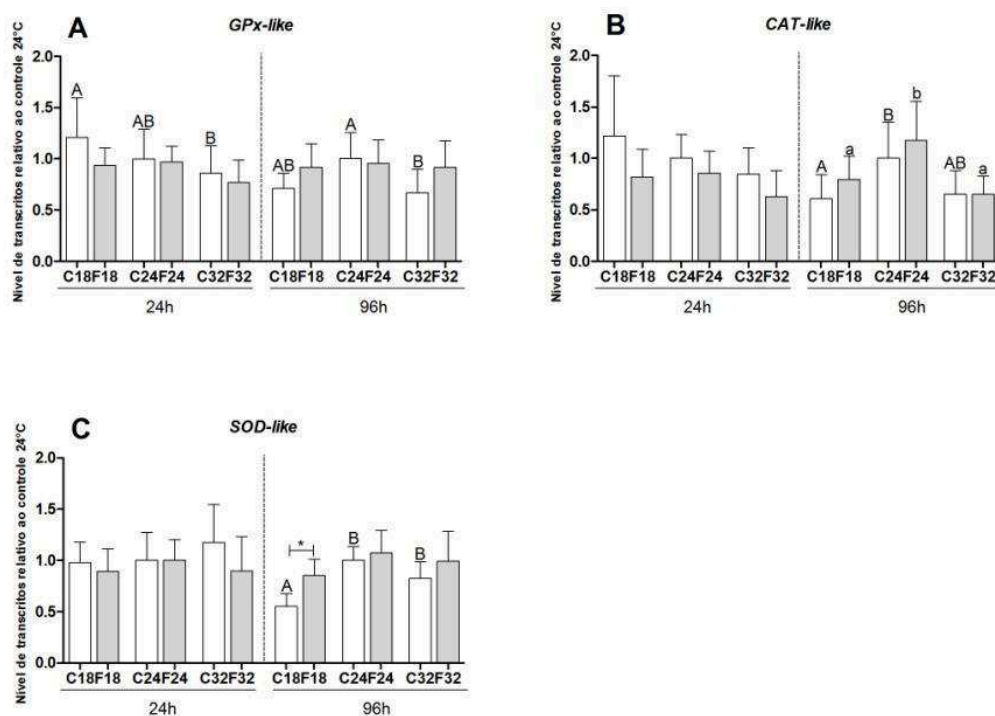
O envolvimento de enzimas de fase II no metabolismo de PHE em animais não é totalmente compreendido. Estudos em humanos fumantes (PATEL et al., 2016; WANG et al., 2012; ZHONG et al., 2011) e hepatócitos humanos (HECHT; BERG; HOCHALTER, 2009) demonstraram que os principais metabólitos gerados após a biotransformação de PHE são derivados de reações de fase I, incluindo a via de diol epóxidos, gerando derivados de tetraol como principais metabólitos. Além disso, nenhum conjugado de sulfato, glutathiona, glicosídeo ou glicuronídeo em metabólitos de PHE foi detectado após incubação de extratos celulares de fungos *Pleurotus ostreatus* com PHE (BEZALEL; HADAR; CERNIGLIA, 1997). Esses dados são consistentes com a falta de ativação da fase II em ostras expostas a PHE.

Em resumo, observou-se efeito da temperatura em todos os genes de biotransformação de fase I e fase II analisados, além do efeito na atividade de GST. Enquanto o efeito do PHE foi observado apenas no nível de transcritos de *CYP2-like2*. Os genes de biotransformação parecem ser mais sensíveis à variação abiótica do que a exposição química (ZACCHI et al., 2017).

#### 2.6.4 Respostas transcricionais e enzimáticas de enzimas antioxidantes em brânquias de *C. brasiliiana*

Níveis de transcritos de genes de enzimas antioxidantes *GPx-like*, *CAT-like* e *SOD-like* e a atividade enzimática de GPx, G6PDH, SOD e CAT foram analisados em brânquias de ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas (Figuras 9 e 10). Com exceção da *SOD-like*, que apresentou maior nível de transcritos no grupo controle de 18°C comparado ao grupo exposto a PHE, após 96 h, não foram observadas diferenças para todos os tratamentos testados entre grupos controle e expostos a PHE. Estes resultados sugerem que a exposição ao PHE não provocou um aumento na produção de ERO nas condições experimentais utilizadas.

Figura 9 - Níveis de transcritos relativos dos genes (A) *Glutathione peroxidase-like* (*GPx-like*) (B) *Catalase-like* (*CAT-like*), (C) *Superóxido dismutase-like* (*SOD-like*) em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a 100 µg.L-1 de fenantreno, em três diferentes temperaturas. O nível de transcrição gênica foi avaliado por qRT-PCR e relativizados pelo controle de 24°C. “C” indica grupo controle e “F” indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto ( $p < 0,05$ ).

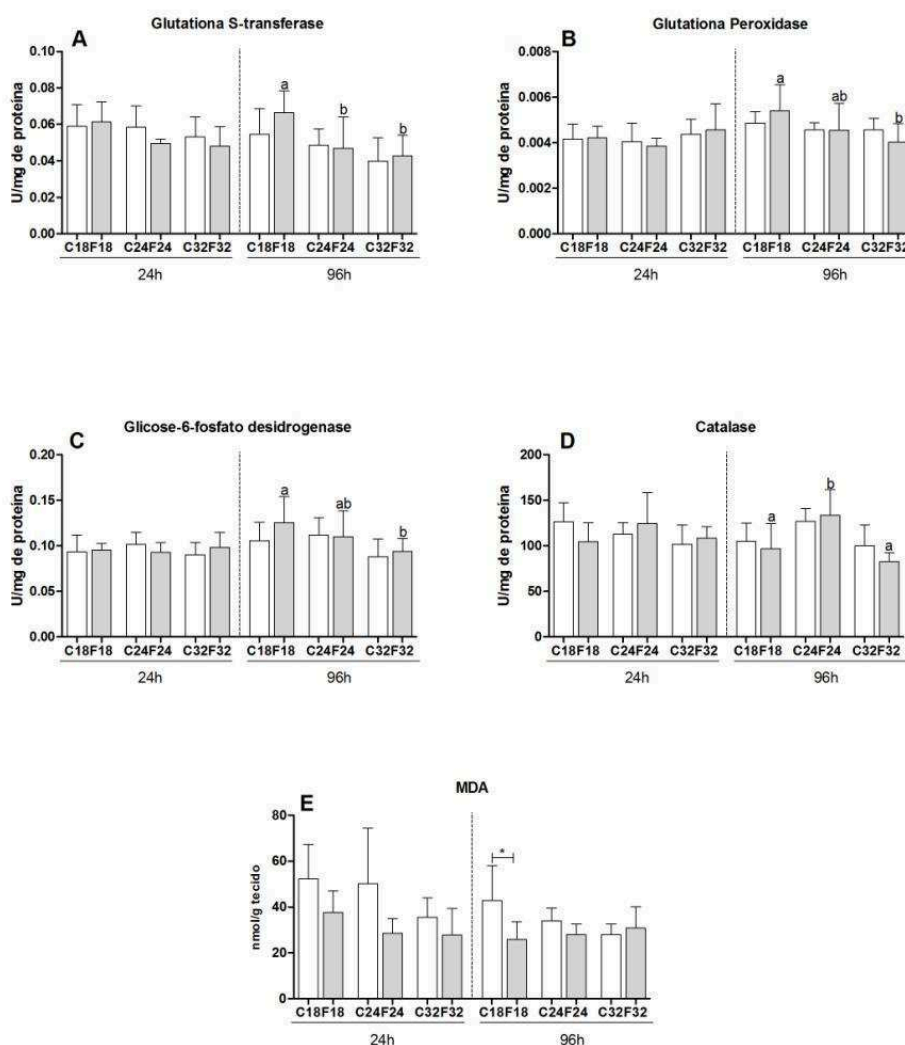


Em geral, a atividade de enzimas antioxidantes e o nível de transcritos dos genes foram maiores a temperaturas mais baixas (18 e 24°C), em comparação com a temperatura mais alta (32°C). Os níveis de transcritos de *GPx-like* no grupo controle mantido a 32°C foram 1,4 vezes mais baixo comparado com ostras mantidas em 18°C, após 24 h de exposição. Resultado semelhante foi observado após 96 h, onde menores níveis de transcritos foram encontrados no grupo controle de 32°C quando comparados a 24°C (Figura 9A). No entanto, um padrão diferente foi observado para os níveis de transcritos de *SOD-like*, *CAT-like* e *GPx-like* em ostras mantidas em diferentes temperaturas após 96 h (Figura 9A-C). Níveis de transcritos de *SOD-like* e *CAT-like* foram 1,5 e 1,6 vezes maiores, respectivamente, em ostras mantidas a 24°C quando comparadas com ostras mantidas a 18°C, e

nível de transcritos de *GPx-like* foi 1,5 vezes maior em ostras mantidas a 24°C comparadas aquelas mantidas a 32°C. No entanto, ostras expostas ao PHE a 24°C apresentaram aumento no nível de transcritos de *CAT-like*, comparado a ostras coexpostas ao PHE em 18°C (1,4 vezes) e 32°C (1,8 vezes). Foi previamente demonstrado que mudanças na temperatura da água alteram significativamente as enzimas antioxidantes e os níveis transcritos de genes em bivalves (AN; CHOI, 2010; BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; ZHANG et al., 2016). De fato, ostras da espécie *C. gigas* exposta a uma mistura de 0,1% de hidrocarbonetos por 21 dias, a 15°C, apresentou níveis mais elevados de transcritos de *SOD* em comparação ao grupo controle (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004).

A atividade de enzimas antioxidantes apresentou níveis levemente mais altos em temperaturas mais baixas (Figura 10). Curiosamente, após 24 h de exposição, as atividades de CAT, GST, GPx e G6PDH (Figs. 10A, B, C e D, respectivamente) foram similares para todos os tratamentos. No entanto, após 96 h de exposição, os efeitos da temperatura nos níveis de transcrição foram mais evidentes nas ostras controle, enquanto os efeitos sobre as atividades de enzimas antioxidantes, foram observados apenas para aqueles grupos expostos ao PHE, por 96 h. Após 96 h de exposição, as atividades de GST, GPx e G6PDH diminuíram significativamente com o aumento da temperatura. Por outro lado, a atividade da CAT foi maior em ostras mantidas 24°C e coexpostas ao PHE, em comparação com aquelas mantidas a 18 e 32°C. A atividade da SOD não mostrou diferença em nenhum grupo testado (dados não mostrados).

Figura 10 - Atividade específica das enzimas (A) Glutaciona-S-transferase (B) Glutaciona peroxidase, (C) Glicose-6-fosfato desidrogenase, (D) Catalase, (E) níveis de peroxidação lipídica quantificados a partir do malondialdeído (MDA) em brânquias de *Crassostrea brasiliana* expostas a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fenantreno, em três diferentes temperaturas ( $18^\circ\text{C}$ ,  $24^\circ\text{C}$  e  $32^\circ\text{C}$ ) por 24h e 96h. "C" indica grupo controle e "F" indica grupo exposto ao PHE. Letras maiúsculas indicam diferença entre grupos controle nas três temperaturas, letras minúsculas indicam diferenças entre grupos expostos nas três temperaturas e \* indica diferença entre grupo controle e exposto ( $p < 0,05$ ).



A solubilidade do oxigênio na água aumenta à medida que a temperatura da água diminui, possivelmente aumentando a captação de oxigênio pelo organismo (LESSER; KRUSE, 2004), o que pode contribuir para o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e transcrição de genes em ostras mantidas em temperaturas mais baixas, quando comparadas àquelas mantidas em temperaturas mais

elevadas. De fato, o efeito das mudanças de temperatura foi mais evidente após 96 h de exposição, indicando um ajuste temporal da transcrição e da atividade de antioxidantes às mudanças de temperatura.

Com exceção da transcrição de *CAT-like* e atividade de CAT, em animais expostos ao PHE, as relações entre os níveis de transcritos e atividades enzimáticas foram inconsistentes, uma vez que mudanças de temperatura provocaram alterações no perfil dos transcritos que não foram refletidas nas atividades enzimáticas. Ao contrário, a temperatura causou alterações nas atividades enzimáticas nos animais expostos ao PHE, por 96 h, apesar de não causar alterações no nível de transcritos. Essas inconsistências também foram observadas por An e Choi (2010) no bivalve *Scapharca broughtonii* exposto a estresse térmico e osmótico. Considerando os diferentes efeitos da temperatura e do PHE na transcrição gênica e nas atividades das enzimas antioxidantes em animais controle e exposto, supõe-se que temperaturas mais baixas modulem positivamente a transcrição de genes antioxidantes, possivelmente devido ao aumento da solubilidade do oxigênio em baixas temperaturas e exposição ao PHE interfere nesse ajuste.

A transcrição gênica não se refletiu na atividade enzimática de animais mantidos a diferentes temperaturas, possivelmente devido à falta de aumento na produção de ERO, como indicado também pela ausência de diferenças na peroxidação lipídica em animais controle e expostos ao PHE (Fig. 4E). Nas ostras expostas ao PHE por 96 h, as atividades mais elevadas de enzimas antioxidantes observadas em temperaturas mais baixas não podem ser explicadas como um reflexo dos níveis de transcrição, já que os níveis de transcritos permaneceram inalterados (exceto para o *CAT-like*). Neste caso, sugere-se que as diferenças são devidas a um efeito de inibição do PHE na defesa antioxidante, à medida que a temperatura aumenta. Esta hipótese é suportada pelas atividades mais altas em temperaturas mais baixas, não foram estatisticamente diferentes dos grupos controle.

Os níveis de peroxidação lipídica também permaneceram inalterados em todos os tratamentos, após 24 h (Figura 10E). No entanto, ostras expostas ao PHE por 96 h, inesperadamente apresentaram níveis significativamente menores de MDA comparado com o grupo controle de 18 e 24°C, mas apenas significativamente a

18°C (Figura 10E). Um aumento na atividade de outras enzimas antioxidantes, não avaliadas neste estudo, poderia diminuir ou inativar a produção de ERO, refletindo nos menores níveis de MDA. Vieiras da espécie *Nodipectus nodosus* mostraram uma diminuição dos níveis de MDA após exposição a 200 µg.L<sup>-1</sup> de PHE (PIAZZA et al., 2016). Piazza e colaboradores (2016) sugerem o envolvimento da enzima aldeído desidrogenase na detoxificação do MDA. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que genes de aldeído desidrogenase foram identificados em uma lista de genes regulados positivamente em ostras *C. brasiliiana* expostas a PHE (K.H.Lüchmann, comunicação pessoal).

## 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do presente estudo foi avaliar biomarcadores moleculares e bioquímicos em brânquias de ostras *C. brasiliiana* em diferentes temperaturas expostas ao PHE. Os níveis de transcrição gênica de fase I e fase II de biotransformação e enzimas antioxidantes foram significativamente afetados pela temperatura. Quando expostos ao PHE, também foi observado um efeito nos níveis de transcrição de *CYP2-like2*, *SOD-like* e *FABP-like*. A interação entre o PHE e a temperatura no nível de transcritos de *CYP2-like2* sugere que, em altas temperaturas, ostras da espécie *C. brasiliiana* foram mais responsivas aos efeitos da PHE, no nível transcricional.

Esses resultados indicam que a transcrição gênica e as atividades enzimáticas são mais sensíveis à variação de temperatura do que a exposição ao PHE. Assim, destacam a importância de considerar a temperatura como um fator de influência no metabolismo de bivalves, mesmo em uma perspectiva de longo prazo, considerando perspectivas de mudanças climáticas em todo o mundo.

### **3 CAPÍTULO 3**

#### **RESPOSTAS AO ESTRESSE EM *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS AOS EFEITOS COMBINADOS DE ALTERAÇÕES AGUDAS DE PH E FENANTRENO**

##### 3.1 RESUMO

A acidificação dos oceanos é resultado da diminuição do pH da água do mar, causada principalmente pelo aumento de CO<sub>2</sub> liberado na atmosfera e sua consequente dissolução na água do mar. Essas mudanças podem ser drásticas para os organismos marinhos, especialmente para ostras *Crassostrea brasiliana*, se outros estressores, como os xenobióticos, estiverem presentes. O efeito de alterações de pH (6,5, 7,0 e 8,2) foi avaliado nos níveis transcritos de biotransformação [citocromo P450 (*CYP2AU1*, *CYP2-like2*) e glutathione S-transferase (*GSTΩ-like*)] e genes antioxidantes [superóxido dismutase (*SOD-like*), catalase (*CAT-like*) e glutathione peroxidase (*GPx-like*)], bem como a atividade enzimática [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)] e peroxidação lipídica (MDA) nas brânquias de *C. brasiliana* expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno (PHE) por 24 e 96 h. Da mesma forma, a carga de PHE foi avaliada em tecidos moles inteiros de indivíduos expostos. O acúmulo de PHE em ostras foi independente do pH. No entanto, a acidificação promoveu uma diminuição significativa nos níveis de transcrição de alguns genes protetores (24 h de exposição: *CYP2AU1* e *GSTΩ-like*; 96 h de exposição: *CAT-like* e *GPx-like*), que não foi observado na presença de PHE. As atividades das enzimas GST, CAT e SOD aumentaram nas ostras expostas à PHE no pH controle (8,2), mas em valores de pH mais baixos, esta ativação foi suprimida, e nenhuma alteração foi observada na atividade da G6PDH e nos níveis de MDA. Os genes de biotransformação mostraram melhores respostas após 24 h, e genes codificadores de antioxidantes após 96 h, juntamente com as atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT), provavelmente porque a biotransformação do PHE aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio. A ausência de alterações nos níveis de MDA sugere que a modulação antioxidante preveniu eficientemente o estresse oxidativo. O efeito do pH



nas respostas à exposição ao PHE deve ser levado em conta antes de usar esses e outros genes como potenciais biomarcadores moleculares para a exposição ao PHE.

**Palavras-chave:** *Crassostrea brasiliana*, pH, fenantreno, transcrição gênica, efeitos bioquímicos.

### 3.2 ABSTRACT

Ocean acidification is a result of the decrease in the pH of marine water, caused mainly by the increase in CO<sub>2</sub> released in the atmosphere and its consequent dissolution in seawater. These changes can be dramatic for marine organisms especially for oysters *Crassostrea brasiliana* if other stressors such as xenobiotics are present. The effect of pH changes (6.5, 7.0 and 8.2) was assessed on the transcript levels of biotransformation [*cytochromes P450 (CYP2AU1, CYP2-like2)* and *glutathione S-transferase (GSTΩ-like)*] and antioxidant [*superoxide dismutase (SOD-like)*, *catalase (CAT-like)* and *glutathione peroxidase (GPx-like)*] genes, as well as enzyme activities [superoxide dismutase, (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferases transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)] and lipid peroxidation (MDA) in the gills of *C. brasiliana* exposed to 100 µg·L<sup>-1</sup> of phenanthrene (PHE) for 24 and 96 h. Likewise, the PHE burdens was evaluated in whole soft tissues of exposed oysters. The accumulation of PHE in oysters was independent of pH. However, acidification promoted a significant decrease in the transcript levels of some protective genes (24 h exposure: *CYP2AU1* and *GSTΩ-like*; 96 h exposure: *CAT-like* and *GPx-like*), which was not observed in the presence of PHE. Activities of GST, CAT and SOD enzymes increased in the oysters exposed to PHE at the control pH (8.2), but at a lower pH values, this activation was suppressed, and no changes were observed in the G6PDH activity and MDA levels. Biotransformation genes showed better responses after 24 h, and antioxidant-coding genes after 96 h, along with the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT), probably because biotransformation of PHE increases the generation of reactive oxygen species. The lack of change in MDA

levels suggests that antioxidant modulation efficiently prevented oxidative stress. The effect of pH on the responses to PHE exposure should be taken into account before using these and any other genes as potential molecular biomarkers for PHE exposure.

**Keywords:** *Crassostrea brasiliana*, pH, phenanthrene, gene transcription, biochemical effects.

### 3.3 INTRODUÇÃO

As emissões atmosféricas de CO<sub>2</sub> devido às atividades humanas aumentaram a uma taxa de 1% ao ano durante os anos 90, atingindo uma taxa de 3,4% ao ano entre 2000 e 2008. Estima-se que até 2030, a concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera chegará a 1900 ppm. Isso contribuirá para um aumento nos níveis de CO<sub>2</sub> da água do mar, favorecendo os processos de acidificação. As águas oceânicas têm um pH relativamente constante de aproximadamente 8,2, em contraste com o pH das águas estuarinas, que podem oscilar durante os ciclos sazonais e diurnos, desde os níveis típicos do oceano aberto até um pH de 7 ou 6 (HUBERTZ; CAHOON, 1999; RINGWOOD; KEPPLER, 2002). As águas estuarinas são caracterizadas por flutuações de CO<sub>2</sub> devido a episódios de produção excessiva de CO<sub>2</sub> pela biota residente que excede sua capacidade de consumo, e/ou às taxas de troca gasosa com a atmosfera e os oceanos abertos. Concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> causam uma diminuição no pH das águas do estuário e, em última análise, dos níveis de pH extracelular e intracelular de organismos estuarinos, como os moluscos, que têm uma capacidade limitada para regulação do pH (ATTIG et al., 2014; CHAPMAN et al., 2011; GONCALVES et al., 2016; TOMANEK et al., 2011). Além disso, o influxo de água doce e a drenagem de solos ácidos podem diminuir ainda mais o pH das águas estuarinas (LOCKWOOD, 1976; PERKINS, 1974; PRITCHARD, 1967).

Os potenciais efeitos negativos da hipercapnia ambiental (PCO<sub>2</sub> elevada) e da acidose em bivalves estuarinos não são totalmente compreendidos, apesar do conhecimento de que esses organismos têm mecanismos compensatórios para equilibrar a acidose induzida pela hipercapnia através da dissolução da concha para aumentar os níveis de bicarbonato interno (BURNETT, 1997; LANNIG et al., 2010; SHIRAYAMA; THORNTON, 2005) e fazem ajustes metabólicos (por exemplo, parada metabólica e mudanças nas vias metabólicas) (LANNIG et al., 2010; MICHAELIDIS; HAAS; GRIESHABER, 2005). Portanto, compreender as respostas fisiológicas e moleculares à hipercapnia em organismos estuarinos poderia fornecer

informações sobre os mecanismos de efeitos de estresse e fatores que limitam a tolerância dessas espécies a níveis elevados de CO<sub>2</sub> e baixo pH (TOMANEK et al., 2011).

A acidificação da água aumenta a geração celular de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando estresse oxidativo em bivalves, mas os mecanismos que levam ao aumento da produção de ERO não são totalmente compreendidos. Tem sido proposto que o CO<sub>2</sub> possa reagir com o peroxinitrito celular (ONOO<sup>-</sup>) para gerar espécies de carbonato, oxigênio e nitrogênio reativo, resultando em dano oxidativo (DENICOLA et al., 1996; MELI et al., 2002). Além disso, o aumento da PCO<sub>2</sub> pode causar acidose intracelular, que afeta negativamente a eficiência da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, resultando no aumento da geração de ERO (MURPHY, 2009; STARKOV, 2006). A acidose intracelular também pode levar à liberação de metais de transição como o Fe<sup>2+</sup>, das reservas intracelulares (DEAN, 2010), aumentando as reações de Fenton que geram os radicais hidroxila (STOHS; BAGCHI, 1995). Além disso, a acidificação da água pode gerar condições hipóxicas em organismos marinhos, que podem aumentar a taxa de geração de ERRO nos mesmos (ALMEIDA; MASCIO, 2011).

Para neutralizar os efeitos do aumento da geração de ERO, os bivalves são capazes de aumentar as defesas antioxidantes nas células, como as enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), evitando assim lesões oxidativas (JEEVA PRIYA et al., 2017). Em um recente estudo proteômico usando *Crassostrea virginica*, Tomanek e colaboradores (2011) mostraram que a hipercapnia e a acidificação da água causam a regulação positiva de proteínas associadas ao citoesqueleto e sistemas de defesa antioxidante, como a SOD e várias peroxirredoxinas, bem como a nucleoredoxina relacionada à tioredoxina. Isso sugere que a exposição à alta PCO<sub>2</sub> induz estresse oxidativo e, além disso, que o citoesqueleto é o principal alvo desses efeitos.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) são um grupo de contaminantes preocupantes no ambiente marinho. As principais fontes de HPA são derramamentos de óleo, efluentes industriais e urbanos, bem como insumos atmosféricos. Por serem hidrofóbicos, podem atravessar facilmente as membranas celulares de organismos vivos e se tornar potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (HANNAM et al., 2010; ZACCHI et al., 2017). Entre os 16 HPA que

precisam ser rotineiramente monitorados em ambientes marinhos (HARITASH; KAUSHIK, 2009), o fenantreno (PHE) é altamente reativo, com potenciais efeitos carcinogênicos devido à sua estrutura de três anéis de benzeno. As concentrações de fenantreno no ambiente marinho variam de 2,83 a 1460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (ANYAKORA et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2006). O fenantreno é facilmente acumulado em organismos aquáticos, causando a ativação de mecanismos de biotransformação e desintoxicação (BEBIANNO; BARREIRA, 2009; BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004). Em bivalves, o PHE é conhecido por induzir estresse oxidativo, imunossupressão, genotoxicidade e alterações no nível da transcrição em genes de biotransformação (EINSPORN; KOEHLER, 2008; HANNAM et al., 2010; LÜCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016; ZACCHI et al., 2017).

Os estudos que mostram os efeitos interativos da acidificação do oceano e da exposição a xenobióticos em organismos marinhos têm foco principalmente nos efeitos adversos dos metais, indicando que a acidificação combinada com a exposição a xenobióticos deve ser levada em consideração ao explorar a toxicidade do metal. No entanto, embora alguns esforços tenham sido feitos, estudos em organismos marinhos sobre os efeitos combinados da acidificação da água do mar devido à hipercapnia e exposição a contaminantes orgânicos, como os HPA, são limitados (GARCIA et al., 2014).

Os bivalves podem ser afetados pela acidificação porque iniciam a calcificação da concha nos estágios iniciais da vida (WESSEL et al., 2018), e seu ciclo de carbonato pode sofrer devido à interferência da acidificação oceânica (ANDERSSON, 2013). Além de sua importância como organismos sentinelas no monitoramento da contaminação ambiental, os bivalves são um importante recurso econômico e alimentar, amplamente cultivado em sistemas de aquicultura em todo o mundo, uma atividade constantemente ameaçada por mudanças na qualidade da água, especialmente devido ao impacto de fontes pontuais e difusas de poluição.

Dada a ampla utilização de bivalves na avaliação da saúde do ambiente marinho, o seu papel ecológico fundamental como base das cadeias alimentares marinhas, importância para a aquicultura e a possibilidade de impactos negativos devido à acidificação e poluição dos oceanos, avaliamos os efeitos de alterações

abruptas no pH (6,5, 7,0 e 8,2) sobre os parâmetros bioquímicos e moleculares de ostras *Crassostrea brasiliiana*, na presença e ausência de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHE. As ostras foram selecionadas para uso neste estudo pois são uma espécie modelo para avaliar a contaminação ambiental, devido a seus hábitos filtradores de alimentação e capacidade de bioacumulação de contaminantes. Os valores de pH foram selecionados com base nas possíveis mudanças diárias e sazonais observadas nas águas costeiras e oceânicas (de 7,8 a 8,2) e nas áreas estuarinas (de 6,5 a 7,0) e na predição de uma redução global do pH de 0,77 unidades em 2030 (BRESSAN et al., 2014; JEEVA PRIYA et al., 2017). Os níveis de transcrição dos genes da biotransformação de xenobióticos de fases I e II foram avaliados, juntamente com os níveis de transcrição e atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica nas brânquias das ostras. Esses resultados são importantes para prever os efeitos do  $\text{CO}_2$  elevado e da acidificação dos oceanos em ostras, particularmente no contexto de cenários futuros de poluição por HPA.

### 3.4 OBJETIVOS

#### 3.4.1 Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de três diferentes pH nas respostas bioquímicas e moleculares em ostras da espécie *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno.

#### 3.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de transcritos de genes envolvidos no sistema de biotransformação, enzimas antioxidantes em brânquias de ostras do mangue em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2) expostas ao PHE na concentração de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , após exposição por 24 e 96 h;
- Analisar a atividade das enzimas catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD), em ostras expostas por 24 e 96 h ao PHE na concentração de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e mantidas em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2);
- Avaliar o nível de peroxidação lipídica quantificado pela concentração de malondialdeído (MDA) nas brânquias de *C. brasiliiana* expostas a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de PHE nas condições citadas acima;
- Determinar os níveis de bioacumulação do fenantreno (PHE) no tecido das ostras após 96 h de exposição em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2).

### 3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.5.1 Animais, aclimação e experimento de exposição

Ostras adultas (n = 240), de tamanho semelhante (6-7 cm), foram coletadas no Laboratório de Moluscos Marinhos, LMM/UFSC, e transportadas vivas até o laboratório. As ostras foram aclimatadas por 7 dias em um aquário aerado de 500 L, sob temperatura controlada (21 °C), salinidade (33), pH (8,2) e foto-período (12 h: 12 h). A água foi renovada diariamente, e as ostras eram alimentadas uma vez por dia com uma mistura de Phyto-Plus A e Phyto-Plus B (Microtube-Lift). Após o período de aclimação, as ostras foram distribuídas aleatoriamente entre seis aquários de vidro de 40 L (n = 40), dois aquários para cada pH (6,5, 7,0 ou 8,2). O pH em cada aquário foi ajustado e mantido usando um sistema de controle de AT (Aqua Medic, Bissendorf, Alemanha) conectado a um computador. Eletrodos foram usados para medição de pH em todos os aquários. O pH foi ajustado por uma válvula solenóide que abre quando o pH aumenta em 0,01 unidades ou mais. Em caso de mudança de pH, o CO<sub>2</sub> foi borbulhado através de cada aquário até que o pH necessário fosse atingido. Detalhes podem ser acessados em Szalaj e colaboradores (2017).

Fenantreno (98% de pureza, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado aos aquários de exposição, de acordo com o pH experimental, para atingir uma concentração nominal final de PHE de 100 µg.L<sup>-1</sup> numa concentração final de DMSO de 0,002% (v/v). A concentração de PHE foi escolhida com base em estudos prévios com *C. brasiliiana*, em que os genes selecionados foram induzidos após exposição a 100 µg.L<sup>-1</sup> de PHE (LÜCHMANN et al., 2011, 2014; ZACCHI et al., 2017). Os grupos controle foram mantidos a pH 8,2, 7,0 e 6,5 com 0,002% (v/v) de DMSO. Após 24 e 96 h, as ostras (n = 10) de cada aquário foram coletadas e suas brânquias foram dissecadas, imersas em reagente de estabilização RNA/ater (Qiagen) e armazenadas a - 20 °C (análise molecular) ou imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em - 80 °C (análises enzimáticas e de peroxidação lipídica).

#### 3.5.2 Bioacumulação do PHE nos tecidos de *C. brasiliiana*



Um *pool* de todos os tecidos (n=10), de cada tratamento, foram secos durante 72 horas em liofilizador (Thermo Savant – modulo D). Em seguida, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente. O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 g de sílica gel e pré-extraída cinco vezes com n-hexano e 1 g de sulfato de sódio. A eluição foi feita com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e foi adicionado os padrão interno (benzo(b)fluoranteno-d<sub>12</sub>). O volume final foi de 1 mL.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC/MS) (6890/5973N, Agilent Technologies), a coluna cromatográfica utilizada foi Agilent Technologies com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons).

A identificação dos HPAs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados através da razão massa/carga (m/z) do íon de quantificação. A quantificação foi feita por razões entre os *surrogates* e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

### 3.5.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das brônquias (aproximadamente 100 mg) dos dez indivíduos de todos os grupos experimentais utilizando o reagente Qiazol (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do RNA de cada amostra foi checada utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. A transcrição reversa para a síntese de cDNA, a partir de 1 µg de RNA total, foi realizada utilizando o QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen). A quantificação

do cDNA da amostra foi realizada como descrito anteriormente, e armazenado a -20 °C para as análises posteriores.

#### 3.5.4 Seleção de genes, desenho dos iniciadores e análises de qPCR em tempo real

Foram selecionadas 11 sequências, a partir do transcriptoma de *C. brasiliensis* (LÜCHMANN et al., 2015), sendo eles 5 genes candidatos a normalizadores e 6 genes codificantes para enzimas do processo de biotransformação e antioxidantes, para análises da transcrição gênica por PCR quantitativo em tempo real. Os pares de iniciadores (Tabela 3) foram desenhados utilizando-se a ferramenta PrimerQuest e os parâmetros de qualidade analisados pela ferramenta OligoAnalyzer do site Integrated DNA Technologies (IDT).

O nível de transcritos dos genes foi quantificado através de reações de PCR em tempo real utilizando QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen). As reações de amplificação foram realizadas com 100 ng de cDNA e 0,7 µM de cada iniciador, utilizando termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen) e o seguinte programa: 2 min a 95°C, 40 ciclos de 5s a 95°C e 10s a 60°C, de acordo com instruções do fabricante. O produto de PCR foi submetido à análise da curva de *melting* (temperatura de 55° a 95°C). No intuito de confirmar a ausência de produtos não específicos e dímeros de iniciadores, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%. A eficiência da reação de PCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores através de uma curva de calibração de diluição seriada com cinco concentrações. Todas as curvas apresentaram R<sup>2</sup> superior a 0,99 e E entre 95% e 105%. O método 2<sup>-C<sub>q</sub></sup> foi utilizado para selecionar os genes normalizadores (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Para o tempo de exposição de 24h o gene *28S-like* foi selecionado como normalizador, enquanto para 96h foi selecionado o gene *40S\_s9-like*. Por fim, todos os dados foram calibrados pela média do grupo controle do pH 8,2.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores usados para amplificação dos genes por RT-qPCR, seus respectivos nomes, amplicons e função molecular.

Nome do gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3'	Tamanho do amplicon (bp)	Função molecular
<i>Catalase-like</i> ( <i>CAT-like</i> )	F - TAC AAC CAC ATC GAG GAC GGG AAG R - TCC TTC TGG GAC CAT ACC TTG GTG	151	Sistema antioxidante
<i>Citocromo P450 2AU1 (CYP2AU1)</i>	F - AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC R - TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA	158	Fase I de biotransformação
<i>Citocromo P450 2-like</i> ( <i>CYP2-like2</i> )	F - CGC TTC GCA GTC CAA GTT GAC AAA R - ATC GTG TTT GGG TTC AGG TAT GCG	136	Fase I de biotransformação
<i>Glutathione peroxidase-like</i> ( <i>GPx-like</i> )	F - CGTTGCCGCCATTGACCTCTATCT R - ACCAGTTTGGAAAGTCAGGAGCCAG	144	Sistema antioxidante
<i>Glutathione S-transferase <math>\Omega</math>-like</i> ( <i>GST<math>\Omega</math>-like</i> )	F - ATT GGC ACA CGT ACC TCG TCT GAT R - TTA ATG GGA CCG CCA GAA GGT CAT	175	Fase II de biotransformação
<i>Superóxido dismutase-like</i> ( <i>SOD-like</i> )	F - GCT CCA GAG GAT ACT GAG AGG CAT R - CCA ATG ATG GAT TGA GGA CCA GCA	124	Sistema antioxidante
<b>Normalizadores</b>			
<i>Anquirina-like</i> ( <i>ANK-like</i> )	F - CATTGGTCGTCCTATTGAACAATCTAAA R - AAGTGATAAAGGTAATTCTCACACAACC	84	Citoesqueleto
<i>28S proteína ribossomal-like (28S-like)</i>	F - CCCGAAGCCAAACACATTCAAGTGG R - GGCTTTCCATTGCGGTCACCTTAG	131	Subunidade ribossomal
<i>40S proteína ribossomal s3-like</i> ( <i>40S_s3-like</i> )	F - CCTGTTATGGAGTGCTACGGTTTATC R - CATTGACTTGGCTCTCTGTCTC	78	Subunidade ribossomal
<i>40S proteína ribossomal s9-like</i> ( <i>40S_s9-like</i> )	F - CCTGTTCCCTTCTTGGCATTCTT R - TGACTTCTCCCTCAGATCACCATA C	98	Subunidade ribossomal
<i>Elongation factor 1-<math>\alpha</math> like (EF1-<math>\alpha</math>-like)</i>	F - ATTGACCAGAGAACCATCGCCAAGT R - ACGCTCAGCCTTGAGTTTGTCCAATA	102	Síntese proteica

### 3.5.5 Ensaios enzimáticos

As brânquias de ostras (aproximadamente 150 mg, n = 10) foram individualmente homogeneizadas em tampão 1:5 (m/v) (TRIS 50 mM, pH 7,6 contendo EDTA 1 mM, sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M, DTT 1 mM e 50  $\mu$ M PMSF) usando um homogeneizador de tecidos (Tissue-Tearor, BioSpec Products). As amostras foram submetidas a centrifugação (9000  $\times$  g, 4 °C por 30 min) e o sobrenadante (fração citosólica) foi coletado para as análises enzimáticas. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do citocromo c na presença de um sistema de geração de superóxido (xantina / xantina oxidase) a 550 nm (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A atividade CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984) monitorando a diminuição da absorbância a 240 nm devido à decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade de GPx foi medida pela taxa de oxidação de NADPH a 340 nm, usando hidroperóxido de cumeno (CuOOH) como substrato, de acordo com Wendel (1981). Similarmente, a atividade de GR foi determinada como a diminuição da absorbância a 340 nm promovida pela oxidação de NADPH, associada à redução de glutathiona dissulfeto (GSSG) (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade de G6PDH foi determinada como o aumento da absorbância a 340 nm, causada pela redução de NADP<sup>+</sup> a NADPH na presença de glicose-6-fosfato (GLOCK; MCLEAN, 1953). A atividade da GST foi quantificada conforme descrito por Keen (1976), após a formação do conjugado entre glutathiona e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm. A concentração de proteína total foi quantificada de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. A quantificação da atividade das enzimas e as concentrações de proteína foram realizadas em um leitor de placa de 96 poços (Spectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

### 3.5.6 Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica nas brânquias (n = 5) foram avaliados pela quantificação do produto formado pela reação de malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA), segundo Almeida e colaboradores (2004). Resumidamente, uma amostra de 100 mg de brânquias foi homogeneizada em 0,3 mL de tampão TRIS 0,1M contendo 0,05% de hidroxitolueno butilado (BHT) (pH 8,0), e 0,3 mL da solução de TBA (0,4% em HCl 0,2 M) foram adicionados a cada amostra. A mistura

foi aquecida a 90 durante 40 min e foi adicionado 1 mL de n-butanol para extrair o derivado MDA-TBA. Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação a  $5000 \times g$  por 3 min a 4 °C e a fração do sobrenadante foi coletada. As amostras foram analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Potência (HPLC) com Detector de Arranjo de Diodos (DAD), modelo Ultimate 3000, acoplado à coluna Acclaim 120 C18 (250 mm  $\times$  2,1 mm  $\times$  5  $\mu$ m) (Thermo Scientific). Os resultados foram avaliados utilizando o software Chromeleon 7 e a estimativa de MDA foi realizada utilizando curva de calibração padrão obtida pela hidrólise de tetrametoxipropano (TMP). A fase móvel utilizada foi o tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) com 40% de metanol, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.5.7 Análises estatísticas

A distribuição dos dados foi analisada pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson e a homocedasticidade foi testada pelo teste de Levene. Quando necessário, os dados foram normalizados usando a transformação logarítmica. Para avaliar os efeitos do pH e PHE, bem como as interações entre os dois fatores nos parâmetros analisados, foi utilizada a ANOVA de duas vias para dados paramétricos, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para dados não paramétricos, uma ANOVA robusta de duas vias foi realizada usando o RFit (versão 0.23.0) (FEYS, 2016), seguida também pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância para as diferenças entre os grupos foi definido como  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R 3.3.3 e GraphPad Prism® 7.

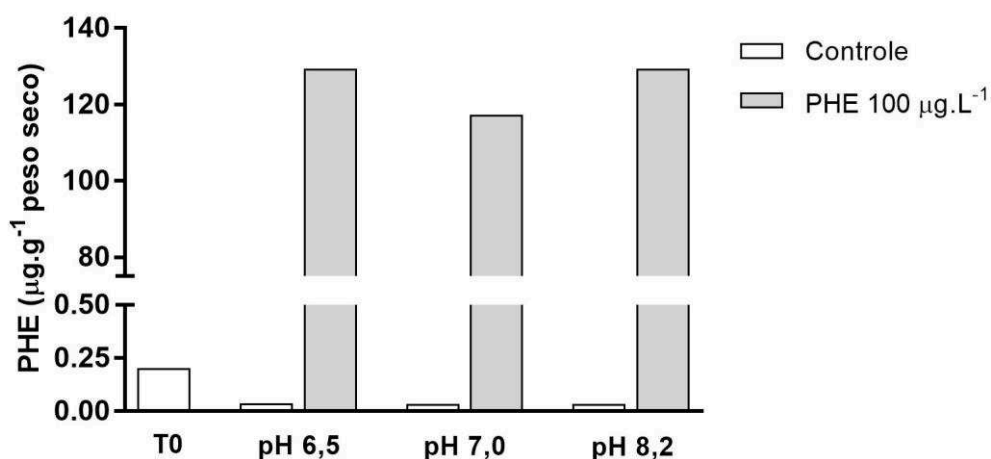
## 3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.6.1 Acúmulo de PHE no tecido das ostras

Os níveis de PHE foram determinados em todos os tecidos de ostras após 96 h de exposição. Ostras expostas ao PHE acumularam quantidades substanciais

do composto, mas nenhuma diferença foi observada nas concentrações de PHE entre ostras expostas ao PHE em diferentes valores de pH. Como um grupo de 10 indivíduos é necessário para a análise das concentrações de PHE, comparações estatísticas entre os tratamentos não foram possíveis (Figura 11). Como mencionado anteriormente, os estudos sobre os efeitos do pH na absorção de contaminantes e bioacumulação em bivalves marinhos são limitados e focados principalmente em metais. *Crassostrea gigas* expostas a  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cálcio por 31 dias aumentaram o acúmulo de metal em pH 7,8 e 7,6 (brânquias 57% e 22%, respectivamente) em comparação com ostras mantidas em pH 8,1 (CAO et al., 2018a). Su e colaboradores (2019) expuseram *Tegillarca granosa* a  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  de benzo[a]pireno (B[a]P por quatro semanas, e os organismos acumularam mais B[a]P em pH 7,8 e 7,4 do que em 8,1 (1,25 e 1,40 vezes respectivamente, comparado com organismos não expostos). Por outro lado, o acúmulo de nitrofurazona e cloranfenicol pelos mesmos organismos foi reduzido sob acidificação (SU et al., 2019). Para compostos polares e iônicos, como metais, alterações no pH da água são um fator importante que pode alterar sua biodisponibilidade em organismos, devido a processos como especiação, precipitação ou adsorção a partículas e alimentos, levando a diferentes padrões de bioacumulação. Além disso, mudanças no pH da água, especialmente devido ao aumento da  $\text{PCO}_2$ , podem afetar a fisiologia respiratória das brânquias, causando alterações na ventilação e, conseqüentemente, na captação de contaminantes. Em nosso estudo, diferenças significativas entre os tratamentos não puderam ser detectadas, mas ficou claro que durante o curto período de 96 h, as ostras foram capazes de acumular quantidades substanciais de PHE, independente do valor do pH da água (Figura 11).

Figura 11 - Níveis de fenantreno ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso seco) em tecidos moles inteiros de ostras *Crassostrea brasiliana* pré-expostas (T0), controles e expostas a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenantreno por 96 h em três pH diferentes (6,5, 7,0 e 8,2) (*pool* n = 10).



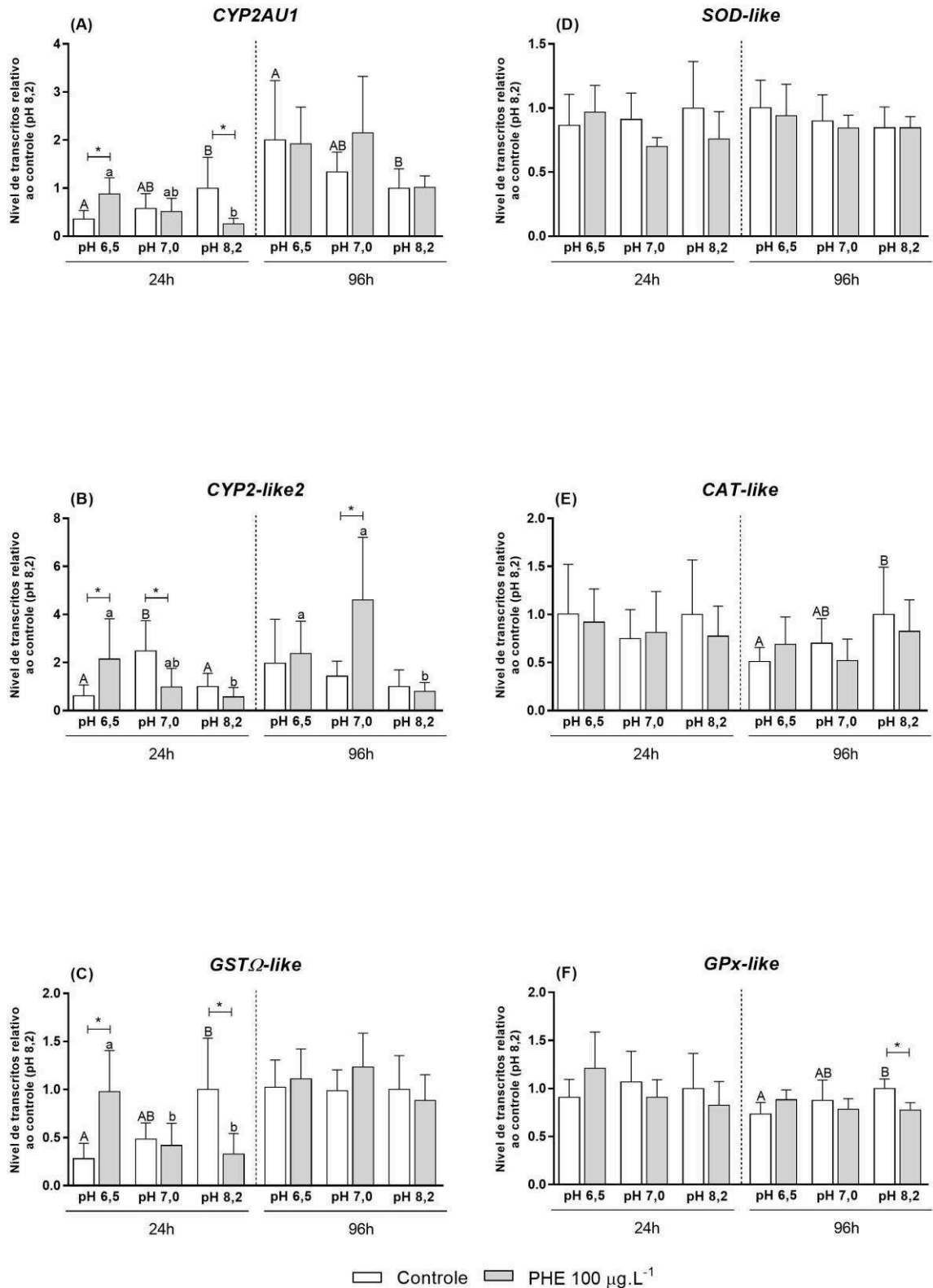
### 3.6.2 Respostas transcricionais de biotransformação e genes antioxidantes em brânquias de *C. brasiliana*

O nível de transcritos dos genes da fase I de biotransformação (*CYP2AU1* e *CYP2-like2*) e de fase II (*GST $\Omega$ -like*) em ostras expostas ao PHE em um gradiente de acidificação foram investigados (Figura 12). Ao comparar as amostras do grupo controle mantidas em diferentes pH, notou-se que o primeiro período de acidificação de 24 h, devido à injeção de  $\text{CO}_2$ , causou uma diminuição significativa no nível de transcritos de *CYP2AU1* e *GST $\Omega$ -like* (Figura 12A e C). Por outro lado, após 96 h, o nível de transcritos de *CYP2AU1* aumentaram com a decréscimo do pH, enquanto não foram observadas alterações significativas ( $p > 0,05$ ) para *GST $\Omega$ -like*, sugerindo um mecanismo de resposta temporal das brânquias para compensar a diminuição inicial nos níveis de transcrição desses genes (Figura 2A e C). Os níveis de *CYP2-like2* também foram significativamente alterados pela mudança de pH, mostrando um aumento nas brânquias de ostras mantidas em pH 7,0, mas não naquelas

mantidas em 6,5, por 24 h. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) após 96 h nos níveis de transcrição de *CYP2-like2* em brânquias de ostras controle mantidas em diferentes valores de pH (Figura 12B). Esses dados sugerem que a acidificação da água é capaz de desequilibrar a transcrição de enzimas de biotransformação após uma súbita mudança no pH, possivelmente devido ao foco primário em mecanismos compensatórios para lidar com alterações nos efeitos do pH e da hipercapnia na água, que poderiam alterar a disponibilidade de importantes componentes celulares envolvidos na ativação da transcrição dos genes da biotransformação. No entanto, as ostras apresentaram grande capacidade de responder aos efeitos negativos da acidificação abrupta da água na transcrição de genes de biotransformação, de forma compensatória, após exposição prolongada (96 h), diminuindo sua vulnerabilidade à exposição a xenobióticos. Além disso, quando desafiados por exposição ao PHE em pH 6,5 durante 24 h, as ostras apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de transcrição de todos os três genes de biotransformação (Figura 12A, B e C). Portanto, é provável que, na ausência do PHE, as ostras tenham se concentrado em ajustes moleculares para lidar com os desafios de pH e hipercapnia, o que afetaria os importantes moduladores da transcrição dos genes de biotransformação, causando a repressão indireta, como, uma vez que a biotransformação não era necessária. No entanto, na presença de PHE, como as ostras tiveram um desafio adicional, elas foram capazes de regular positivamente genes de biotransformação, talvez ao custo de afetar algumas respostas importantes à flutuação do pH e à hipercapnia, o que ainda precisa ser esclarecido.



Figura 12 - Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP2-like2*, (B) *CYP2AU1*, (C) *GSTΩ-like*, (D) *SOD-like*, (E) *CAT-like* e (F) *GPx-like* em brânquias de *Crassostrea brasiliana* (n = 10) expostas a 100 µg.L<sup>-1</sup> de fenantreno em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2) por 24 e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam médias entre controles. Letras minúsculas comparam médias entre tratamentos. Os asteriscos (\*) indicam diferenças no controle versus fenantreno no seu pH. Os valores estão representados como nível de transcritos referente ao grupo controle mantido em pH 8,2 ± desvio padrão (p < 0,05).



Quando expostos ao PHE por 24 h, somente as ostras mantidas no menor pH (6,5) foram capazes de aumentar significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de transcrição de todos os três genes de biotransformação em comparação com o grupo controle (Figura 12A, B e C), em contraste com estudos anteriores, em que a exposição ao PHE regulou significativamente os mesmos genes a pH 8,2 (LÜCHMANN et al., 2014; ZACCHI et al., 2017). De fato, em pH 8,2, o nível de transcritos de *CYP2AU1* e *GSTΩ-like* foram significativamente regulados negativamente em ostras expostas a PHE em comparação com animais de controle, enquanto a transcrição de *CYP2-like2* foi significativamente menor ( $p < 0.05$ ) em pH 7,0 (Figura 12A, B e C). Tais mudanças não são um reflexo da diminuição dos níveis de transcritos nos controles devido à diminuição do pH, já que os níveis de transcrição de todos os três genes de biotransformação também foram significativamente maiores nas ostras expostas à PHE em pH 6,5 do que os níveis em ostras expostas ao PHE em pH 8,2. As razões pelas quais os genes de biotransformação não responderam ao PHE em pH 8,2, como observado em estudos anteriores, ainda precisam ser esclarecidos. De fato, Zacchi e colaboradores (2017) observaram um aumento no nível de transcritos desses genes em ostras expostas ao PHE, mas apenas em salinidades extremas, o que sustenta a hipótese de que as ostras precisam de um desafio adicional para aumentar a transcrição de genes de biotransformação. Em outras palavras, em condições ambientais ótimas, como a salinidade da água ideal ou pH, o PHE a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  não representaria um desafio substancial para causar um aumento na transcrição dos genes *CYP2AU1*, *CYP2-like2* e *GSTΩ-like*, enquanto a alteração de condições ambientais ótimas aumenta a susceptibilidade das ostras aos efeitos tóxicos do PHE, instigando a regulação positiva dos genes de biotransformação como um mecanismo de proteção. Além disso, no estudo apresentado no segundo capítulo dessa tese, o nível de transcritos desses mesmos três genes foi significativamente alterado em ostras expostas ao PHE em diferentes temperaturas, indicando que outros fatores ambientais ou biológicos, como o desenvolvimento e os ciclos reprodutivos, podem afetar a maneira como esses genes respondem PHE em ostras.

Um efeito semelhante de diferentes fatores foi relatado por outros autores. Cao e colaboradores (2018b) mostraram que a presença de *Vibrio regalia* regulou negativamente o nível de transcritos de *GST* em *C. gigas*, enquanto a acidificação foi

capaz de induzir sua transcrição, o que é contrário aos nossos resultados. No entanto, quando esses autores analisaram ambos os fatores juntos, o nível de transcritos de *GST* também foi induzido. Ambos os estudos indicam que a acidificação altera as respostas dos mecanismos moleculares nas ostras, e mais estudos são necessárias para entender adequadamente como o pH altera o metabolismo dos organismos. Diferenças nos níveis de transcrição de *GST $\Omega$*  em bivalves expostos a HPA indicam que esta isoforma é um potencial biomarcador molecular para exposição a PHE (LÜCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016; ZHANG et al., 2012). No entanto, em ostras expostas a PHE em diferentes salinidades, apenas o efeito da salinidade foi significativo, indicando que, em condições de baixa salinidade, houve um aumento no nível de transcritos desse gene (ZACCHI et al., 2017).

Quanto aos genes antioxidantes, observou-se que o nível de transcritos de *SOD-like* não foram alterados significativamente por mudança de pH ou exposição a PHE ( $p > 0,05$ ) (Figura 12D). O nível de transcritos de *CAT-like* e *GPx-like* também foram inalterados após 24 h de exposição a diferentes pH e PHE ( $p > 0,05$ ) (Figura 2E e F). Por outro lado, após 96 h de acidificação da água, uma diminuição significativa nos níveis de transcritos de genes *CAT-like* e *GPx-like* foi observada nos grupos controle, sugerindo que a acidificação da água aumenta a suscetibilidade das brânquias ao estresse oxidativo (Figura 2E e F). A exposição ao PHE não alterou significativamente os níveis de transcrição dos genes antioxidantes ( $p > 0,05$ ), exceto para *GPx-like*, que diminuiu significativamente após 96 h em pH 8,2 ( $p < 0,05$ ), indicando que a exposição ao PHE diminui a capacidade das ostras em aumentar as defesas antioxidantes. A presença de PHE previne a diminuição dos transcritos de antioxidantes, o que foi observado em ostras controle em pH mais ácido, indicando que a acidificação combinada com a exposição ao PHE provavelmente aumenta a pronunciada geração de ERO nas células (Figura 2D, E e F).

Ao contrário do observado no presente trabalho, um estudo proteômico de ostras *C. virginica* submetidas a hipercapnia por duas semanas, após um período de aclimatização de uma semana, revelou uma significativa regulação positiva de

proteínas relacionadas a defesas antioxidantes (TOMANEK et al., 2011). Além disso, o transcriptoma de caranguejo *Hyas araneus* exposto a altas concentrações de CO<sub>2</sub> por 10 semanas revelou uma regulação positiva de genes relacionados às defesas antioxidantes, especialmente os genes associados à desintoxicação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), como *GPx*, *peroxirredoxina* e *ascorbato peroxidase*, indicando potencial estresse oxidativo em *H. araneus* após exposição a CO<sub>2</sub> (HARMS et al., 2014). No entanto, deve-se notar que esses resultados foram obtidos após duas (TOMANEK et al., 2011) ou 10 (HARMS et al., 2014) semanas de exposição ao CO<sub>2</sub>, enquanto que as ostras do presente estudo foram submetidas a uma exposição abrupta e de curto período (24 e 96 h) ao CO<sub>2</sub>, o que poderia explicar a baixa regulação de genes antioxidantes. Também deve ser mencionado que, apesar de um aumento geral dos genes antioxidantes em *H. araneus*, alguns dos genes antioxidantes estavam, de fato, com regulação negativa, incluindo *SOD*, *G6PDH* e *tioredoxinas*, o que concorda parcialmente com nossos resultados.

O mecanismo pelo qual as mudanças de pH afetam a transcrição dos genes não é claro, mas existem algumas hipóteses prováveis. Uma possibilidade é o efeito do pH no próprio metabolismo. Michaelidis e colaboradores (2005) mostraram que mexilhões submetidos à acidificação apresentam uma queda rápida no pH extracelular (pHe) em 0,2 unidades, levando a uma diminuição de 60% na taxa metabólica padrão, o que indica depressão metabólica. A depressão do metabolismo como primeira resposta à acidificação da água levaria, por sua vez, a uma diminuição na transcrição de genes antioxidantes. No presente estudo, as ostras foram aclimatadas a pH 8,2 e depois transferidas para pH 7,0 e 6,5 por um período de 8 h antes de serem expostas ao PHE. Talvez durante esse período, as ostras foram expostas a uma queda abrupta e significativa no pH, o que desencadeou uma resposta biológica global à adaptação à queda de pH, que se refletiu negativamente na capacidade de responder à exposição ao PHE. Um estudo anterior relatou um decréscimo transitório seguido por um aumento no nível de transcritos de transportadores de íons como Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase em brânquias de peixe em pH baixo (DEIGWEIHER et al., 2008), como um mecanismo compensatório osmótico e ácido-base. Ostras em hipercapnia apresentaram aumento na transcrição da *anidrase carbônica* no manto e diminuição nas brânquias (BENIASH et al., 2010), indicando uma tentativa de manter o equilíbrio do pH intracelular nessas condições.

Essa hipótese precisa ser confirmada, mas a resposta transcricional de pelo menos alguns genes de biotransformação em *C. brasiliiana* foi dependente do pH, possivelmente como consequência de ajustes metabólicos à hipercapnia.

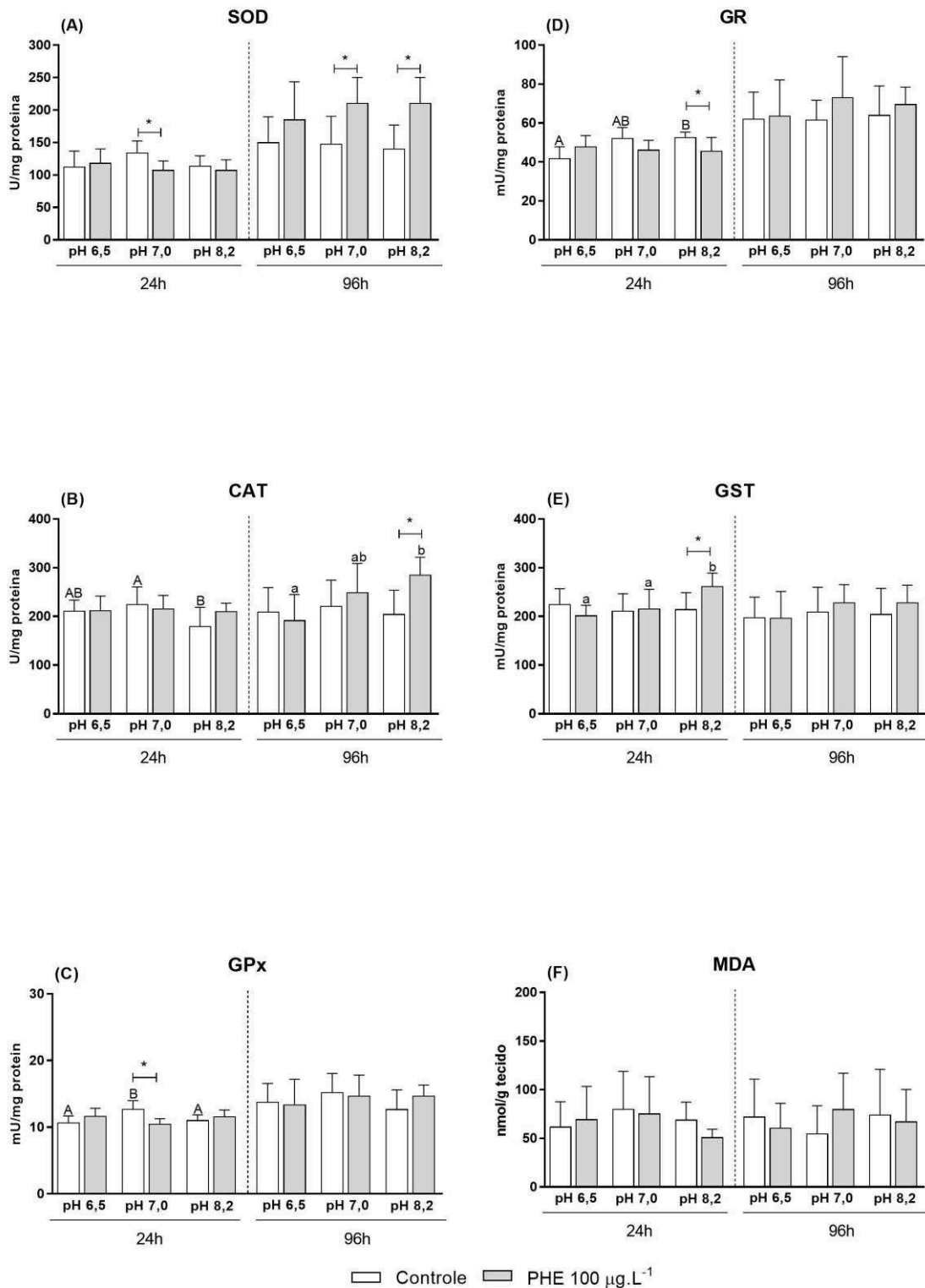
### 3.6.3 Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de *C. brasiliiana*

Ostras mantidas em pH 7,0, sem PHE, apresentaram aumento significativo nas atividades de CAT e GPx ( $p < 0,05$ ), enquanto aquelas mantidas em pH 6,5 apresentaram diminuição significativa na atividade de GR na ausência de PHE, após 24 h, quando comparadas com ostras em pH 8,2 ( $p < 0,05$ ) (Figura 13B, C e D). Em ostras expostas ao PHE por 24 h, a atividade da GST aumentou apenas nas ostras mantidas em 8,2 (Figura 13E). Após 96 h, a alteração do pH não causou nenhuma variação significativa nas enzimas antioxidantes ( $p > 0,05$ ) (Figura 13A, B, C e E). Exceto pela diminuição da GR (Figura 13D), esses resultados concordam com outros estudos que mostraram aumento nas defesas antioxidantes em ostras sob hipercapnia (IVANINA et al., 2015; MOREIRA et al., 2018; TOMANEK et al., 2011), sugerindo que a hipercapnia induz estresse oxidativo em bivalves. No entanto, os ajustes antioxidantes devido ao elevado nível de CO<sub>2</sub> podem depender do estágio de desenvolvimento do organismo. Moreira e colaboradores (2018) observaram que ostras juvenis, ao contrário dos adultos, tendem a diminuir as atividades de SOD e CAT em condições hipercápnicas, sugerindo que neste estágio as ostras apresentam um uso preferencial de GSH como uma importante defesa antioxidante, ao invés de outras enzimas antioxidantes (SOD e CAT), possivelmente porque é energeticamente menos dispendioso. Além disso, o estresse oxidativo devido à hipercapnia em bivalves parece ser temporal, de acordo com a ativação de mecanismos antioxidantes compensatórios durante o curso da exposição a altos níveis de CO<sub>2</sub>.

Matoo e colaboradores (2013) observaram um aumento na capacidade antioxidante total e níveis de carbonila (indicativo de lesão oxidativa de proteínas) em ostras (*C. virginica*) expostas a hipercapnia moderada por 2 a 8 semanas, mas nenhuma diferença nesses marcadores de estresse oxidativo ocorreu durante 8 a 15

semanas de exposição, sugerindo que a exposição a longo prazo ao CO<sub>2</sub> moderadamente elevado afeta minimamente o status redox celular nessa espécie de bivalve. Nesse estudo, a acidificação da água afetou apenas as atividades das enzimas antioxidantes (aumento de SOD e CAT/diminuição de GR) após 24 h, o que poderia indicar a geração de ERO durante o primeiro período de ajustes na hipercapnia, como discutido para os níveis diminuídos dos transcritos de genes antioxidantes (Figura 13A, B e D). A ausência de alterações nas atividades das enzimas antioxidantes após 96 horas pode indicar que as ostras foram capazes de ajustar seu metabolismo para diminuir a produção de ERO, possivelmente diminuindo sua taxa metabólica. Numerosos estudos têm mostrado que, sob condições de depressão metabólica, os bivalves são capazes de manter níveis basais ou mesmo aumentar as atividades de enzimas antioxidantes, prevenindo o estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2005; HERMES-LIMA et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2017; WELKER et al., 2013). De acordo com isso, não foram observadas mudanças significativas nos níveis de MDA de ostras mantidas em pH de água diferente ( $p > 0,05$ ) (Figura 13F).

Figura 13 - Atividade enzimática de (A) Superóxido dismutase, (B) Catalase, (C) Glutaciona peroxidase, (D) Glutaciona redutase, (E) Glutaciona S-transferase e (F) níveis de peroxidação lipídica quantificados a partir de malondialdeído (MDA) em brânquias de *Crassostrea brasiliana* (n = 10) expostas a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de fenantreno em três diferentes pH (6,5, 7,0 e 8,2) por 24 e 96 h de exposição. Letras maiúsculas comparam médias entre controles. Letras minúsculas comparam médias entre tratamentos. Os asteriscos (\*) indicam diferenças no controle versus fenantreno no seu pH.



A combinação de acidificação da água e PHE por 24 h causou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nas atividades de SOD e GPx nas ostras mantidas em pH 7,0, sugerindo um efeito inibitório do PHE nessas enzimas em ambiente ácido moderado (Figura 13A e C). O PHE também causou uma diminuição na atividade de GR em pH 8,2, mas aumentou a atividade de GST nesse mesmo pH após 24 h (Figura 13D e E). O aumento na GST foi provavelmente devido à ativação do processo de biotransformação de fase II, para desintoxicar o PHE. Por outro lado, a inibição de enzimas antioxidantes representaria um aumento na suscetibilidade ao estresse oxidativo, mas nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de MDA. Após 96 h, o PHE causou um aumento nas atividades de SOD (pH 7,0 e 8,2) e CAT (pH 8,2), sugerindo ainda a geração de ERO devido ao acúmulo de PHE (Figura 13A e B). Apesar dessa variação nas defesas antioxidantes, não foram observadas alterações significativas nos níveis de MDA, indicando que as ostras foram capazes de neutralizar qualquer aumento nas ERO devido à exposição ao PHE ou alterações no pH da água.

Curiosamente, mudanças na atividade enzimática não foram seguidas por alterações nos níveis de transcrição de enzimas antioxidantes. Em geral, o pH ou o PHE causam uma diminuição nos níveis de transcrição de enzimas antioxidantes, enquanto causaram aumento nas atividades das enzimas, especialmente durante as primeiras 24 h. Apesar da falta de relação entre os níveis de transcritos e atividade enzimáticas, ficou claro que o pH e/ou a exposição ao PHE causaram uma modulação significativa das defesas antioxidantes, indicando que o estresse oxidativo é um efeito chave da hipercapnia e intoxicação por PHE. No entanto, considerando as condições experimentais utilizadas (valores de pH testados, concentração de PHE e duração da exposição), os presentes resultados demonstram que as ostras são capazes de evitar o estresse oxidativo, pois não foram observadas alterações significativas na peroxidação lipídica.

### 3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações agudas no pH, levando à acidificação, causam uma diminuição geral nos níveis de transcrição dos genes de biotransformação após 24 h, um efeito que foi equilibrado após 96 h. Na presença de PHE, tal diminuição não foi evidente,



sugerindo a manutenção de enzimas de biotransformação que lidam com a intoxicação por PHE. Além disso, a curta duração da exposição à acidificação provocou uma diminuição significativa nos níveis de transcrição dos genes antioxidantes, e alterou as atividades de algumas enzimas antioxidantes, indicando que a exposição ao CO<sub>2</sub> pode aumentar a geração de ERO. No entanto, as ostras demonstraram a capacidade de lidar com qualquer possível aumento na geração de ERO, uma vez que não foram observadas diferenças nos níveis de peroxidação lipídica. Diante desses resultados, propõe-se que o pH da água seja considerado quando se utilizam esses biomarcadores moleculares e bioquímicos para avaliar os efeitos da exposição ao PHE em bivalves.

#### 4 CONCLUSÕES FINAIS

Os biomarcadores bioquímicos e moleculares avaliados nesse estudo foram significativamente afetados pela temperatura, pH e PHE, bem como foi observado o efeito interativo entre o PHE e temperatura/pH.

- Em ambos os experimentos o PHE monitorado na água do mar revelou que as ostras possuem a capacidade de bioacumular esse composto, e esse resultado foi corroborado pelos níveis de PHE nos tecidos das ostras expostas ao PHE em diferentes temperaturas.

- Os genes envolvidos na fase I e II da biotransformação de xenobióticos na exposição ao PHE combinada com temperatura e pH apresentaram diferentes alterações. Os níveis de transcritos de *CYP2-like2* apresentaram efeitos interativos entre PHE e temperatura, essa interação pode indicar que, na temperatura de 32°C, o efeito do PHE, nos níveis de transcritos desse gene pode ser potencializado. Na exposição ao PHE em diferentes pH, os efeitos interativos foram observados nos genes *CYP2-like2*, *CYP2AU1* e *GSTΩ-like*, o que indica que em pH menores esses genes foram mais responsivos ao efeito do PHE, tendo seu nível de transcritos aumentado.

Esses genes foram responsivos a exposição a PHE, no entanto, pH e temperatura também têm efeito em seus níveis de transcrito.

- Genes de enzimas com atividade antioxidante *CAT-like* e *GPx-like* tiveram efeito da temperatura, enquanto a *SOD-like* apresentou aumento dos níveis de transcritos frente a exposição do PHE, em 18°C. Esses resultados podem indicar uma resposta a ERO geradas pela exposição ao PHE. Somente após 96 h, os níveis de transcritos da *CAT-like* apresentaram o efeito do pH e *GPx-like* o efeito da interação. A diminuição no nível de transcritos pode estar associada uma diminuição da capacidade de aclimação das ostras em concentrações mais elevadas de CO<sub>2</sub>.

- As enzimas antioxidantes SOD e CAT apresentaram maior atividade após exposição ao PHE em pH 7,0 e 8,0, o que poderia indicar um aumento de ERO. Mas a ausência de alterações nos níveis de peroxidação lipídica sugere que as defesas antioxidantes das ostras foram capazes de lidar com esse aumento de ERO.

O efeito da temperatura e do pH, assim como os efeitos interativos entre temperatura/pH e PHE, devem ser levados em conta antes de utilizar esses e outros genes e enzimas como potenciais biomarcadores frente a exposição a PHE. Mais estudos considerando outros fatores abióticos juntamente com HPA são necessários para elucidar como esses fatores podem estar interferindo nas respostas bioquímicas e moleculares.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

AKCHA, F.; BURGEOT, T.; COIS, J. Metabolic Activation of PAHs : Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis. 2003.

ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017.

ALMEIDA, E. A. DE et al. 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 - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 4, p. 588–600, 2007.

ALMEIDA, E. A. DE; MASCIO, P. DI. Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates. In: NOWAKOWSKA, A.; CAPUTA, M. (Eds.). . **Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates**. 1. ed. Kerala: Research Signpost, 2011. p. 39–55.

ALMEIDA, E. A. et al. DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 2, p. 270–275, 2003.

ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5–6, p. 386–392, 2004.

ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, n. 1, p. 21–30, 2005.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, 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 - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 1, p. 34–42, 2010.

ANDERSSON, A. J. The Oceanic CaCO<sub>3</sub> Cycle. **Treatise on Geochemistry: Second Edition**, v. 8, p. 519–542, 2013.

ANESTIS, A. et al. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 2, p. R911–R921, 2007.

ANESTIS, A. et al. Response of *Mytilus galloprovincialis* (L.) to increasing seawater temperature and to martellosis: Metabolic and physiological parameters. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 156, n. 1, p. 57–66, 2010.

ANYAKORA, C. et al. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1–2, p. 323–330, 2005.

ATTIG, H. et al. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). **Marine Environmental Research**, v. 94, p. 65–71, 2014.

BAIN, L. J. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 379–383, 2002.

BANNI, M. et al. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 160, n. 1, p. 23–29, 2014.

BANNI, M. et al. Molecular and Cellular Effects Induced in *Mytilus galloprovincialis* Treated with Oxytetracycline at Different Temperatures. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128468, 2015.

BARBOSA, J. S. et al. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320–325, 2010.

BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 357–389, 2000.

BEBIANNI, M. J.; BARREIRA, L. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1849–1860, 2009.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 285–298, 2001.

BENIASH, E. et al. Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 419, n. November, p. 95–108, 2010.

BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C. E. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2495–2501, 1997.

BHAGAT, J.; SARKAR, A.; INGOLE, B. S. DNA Damage and Oxidative Stress in Marine Gastropod *Morula granulata* Exposed to Phenanthrene. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 4, 2016.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, n. January, p. 9–19, 2012.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, n. 1–2, p. 147–157, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRESSAN, M. et al. Does seawater acidification affect survival, growth and shell integrity in bivalve juveniles? **Marine Environmental Research**, v. 99, p. 136–148, 2014.

BURNETT, L. E. The Challenges of Living in Hypoxic and Hypercapnic. **American Zoologist**, v. 37, p. 633–640, 1997.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of

pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: \ra practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295–311, 2000.

CAO, R. et al. Seawater acidification aggravated cadmium toxicity in the oyster *Crassostrea gigas*: Metal bioaccumulation, subcellular distribution and multiple physiological responses. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 809–823, 2018a.

CAO, R. et al. CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification impairs the immune function of the Pacific oyster against *Vibrio splendidus* challenge: An integrated study from a cellular and proteomic perspective. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 1574–1583, 2018b.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, n. 1955, p. 484–490, 1985.

CARVALHO, C. DOS S. et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 60–69, 2012.

CAVRET, S.; FEIDT, C. Intestinal metabolism of PAH: In vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 22–32, 2005.

CHAPMAN, R. W. et al. The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 7, p. 1431–1449, 2011.

CHEN, K. et al. Alteration of development and gene expression induced by in ovo-nano-injection of 3-hydroxybenzo[c]phenanthrene into Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 194–204, 2017.

CLARK, M. S. et al. Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 10, p. 3283–3297, 2013.

DA SILVA, A. Z. et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 376–382, 2005.

DEAN, J. B. Hypercapnia causes cellular oxidation and nitrosation in addition to acidosis: implications for CO<sub>2</sub> chemoreceptor function and dysfunction. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 6, p. 1786–1795, 2010.

DEIGWEIHER, K. et al. Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 295, n. 5, p. R1660–R1670, 2008.

DENICOLA, A. et al. Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide / Bicarbonate : Kinetics and Influence on. v. 333, n. 1, p. 49–58, 1996.

DOS REIS, I. M. M. et al. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (*CYP2AU1*) in *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 79–89, 2015.

EINSPORN, S.; KOEHLER, A. Immuno-localisations (GSSP) of subcellular accumulation sites of phenanthrene, aroclor 1254 and lead (Pb) in relation to cytopathologies in the gills and digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 185–186, 2008.

ERTL, N. G. et al. Molecular analysis of the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) CO<sub>2</sub> stress response. **Climate Change Responses**, v. 3, n. 1, p. 6, 2016.

ESTEVES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3–4, p. 262–274, 2006.

FABBRI, E.; VALBONESI, P.; FRANZELLITTI, S. HSP expression in bivalves. p. 135–161, 2008.

FEYS, J. Nonparametric Tests for the Interaction in Two-way Factorial Designs Using R. **The R Journal**, v. 8, n. 1, p. 367–378, 2016.

FLORES-NUNES, F. et al. Changes in protein expression of pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ to urban sewage. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17267–17279, 2015.

FREIRE, M. M. et al. Biomarcadores Na Avaliação Da Saúde Ambiental Dos Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 347–354, 2008.

GALLOWAY, T. S. et al. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 10, p. 2219–2226, 2002.

GARCIA, R. N. et al. Interactive Effects of Mosquito Control Insecticide

Toxicity, Hypoxia, and Increased Carbon Dioxide on Larval and Juvenile Eastern Oysters and Hard Clams. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, n. 3, p. 450–462, 2014.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **The Biochemical journal**, v. 55, n. 3, p. 400–8, 1953.

GONCALVES, P. et al. Rapid transcriptional acclimation following transgenerational exposure of oysters to ocean acidification. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 19, p. 4836–4849, 2016.

GONZALEZ, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 569, n. 1–2, p. 101–110, 2005.

GONZÁLEZ, J. J. et al. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 5–7, p. 250–259, 2006.

GROVES, J. T. Cytochrome P450 enzymes: understanding the biochemical hieroglyphs. **F1000Research**, v. 178, n. 0, p. 1–7, 2015.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Perspective**, v. 21, n. December 2007, p. 70–83, 2008.

GUENGERICH, F. P.; WATERMAN, M. R.; EGLI, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8, p. 625–640, 2016.

HANNAM, M. L. et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 779–784, 2010.

HARDEGE, J. D. et al. Analytical challenges and the development of biomarkers to measure and to monitor the effects of ocean acidification. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1320–1326, 2011.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 1–15, 2009.

HARMS, L. et al. Gene expression profiling in gills of the great spider crab



*Hyas araneus* in response to ocean acidification and warming. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 789, 2014.

HARNEY, E. et al. Non-additive effects of ocean acidification in combination with warming on the larval proteome of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 151–161, 2016.

HECHT, S. S.; BERG, J. Z.; HOCHALTER, J. B. Preferential glutathione conjugation of a reverse diol epoxide compared to a bay region diol epoxide of phenanthrene in human hepatocytes: Relevance to molecular epidemiology studies of glutathione-s-transferase polymorphisms and cancer. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 426–432, 2009.

HEISE, K. et al. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 79–90, 2003.

HERMES-LIMA, M. et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 1122–1143, 2015.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 6, p. 411–21, 2014.

HUBERTZ, E. D.; CAHOON, L. B. Short-Term Variability of Water Quality Parameters in Two Shallow Estuaries of North Carolina. **Estuaries**, v. 22, n. 3, p. 814, 1999.

IVANINA, A. V. et al. Effectsofenvironmental hypercapnia and metal (Cd and Cu) exposure on acid-base and metal homeostasis of marine bivalves. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 174–175, n. 1, p. 1–12, 2015.

IZAGIRRE, U. et al. Combined effects of thermal stress and Cd on lysosomal biomarkers and transcription of genes encoding lysosomal enzymes and HSP70 in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 4, p. 145–156, 2014a.

IZAGIRRE, U. et al. Combined effects of thermal stress and Cd on lysosomal biomarkers and transcription of genes encoding lysosomal enzymes and HSP70 in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 145–156, 2014b.

JEEVA PRIYA, R. et al. Biomarker response of climate change induced ocean acidification and hypercapnia studies on brachyurian crab *Portunus pelagicus*. **Global J. Environ. Sci. Manage**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2017.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 45, p. 57–88, 2000.

KAMEL, N. et al. Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a]pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 534–543, 2012.

KANDEL, S. E.; LAMPE, J. N. Role of protein–protein interactions in cytochrome P450-mediated drug metabolism and toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 1474–1486, 2014.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

LACERDA, L. D. DE; MALM, O.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 173–190, 2008.

LANNIG, G. et al. Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* - Changes in metabolic pathways and thermal response. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2318–2339, 2010.

LANNIG, G.; FLORES, J. F.; SOKOLOVA, I. M. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. v. 79, p. 278–287, 2006.

LAZOSKI, C. et al. 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.

LESSER, M. P.; KRUSE, V. A. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: Metabolic enzymes, oxidative stress and heat

shock proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 137, n. 3, p. 495–504, 2004.

LIU, J. et al. The effect of reciprocal active site mutations in human cytochromes P450 1A1 and 1A2 on alkoxyresorufin metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 1, p. 33–43, 2004.

LIU, W. et al. Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

LIVINGSTONE, D. R. Response of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. **Marine Ecology Progress Series**, v. 46, p. 37–43, 1988.

LOCKWOOD, A. P. M. Physiological adaptation to life in estuaries. In: **Adaptation to Environment**. [s.l.] Butterworth & Co (Publishers) Ltd, 1976. v. 1p. 315–392.

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 652–660, 2011.

LÜCHMANN, K. H. et al. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324–334, 2014.

LÜCHMANN, K. H. et al. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic Toxicology**, v. 166, p. 10–20, 2015a.

LÜCHMANN, K. H. et al. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 166, p. 10–20, 2015b.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.

MATOO, O. B. et al. Interactive effects of elevated temperature and CO<sub>2</sub>

levels on metabolism and oxidative stress in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 164, n. 4, p. 545–553, 2013.

MCCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocyanin (hemocyanin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.

MCMANUS, M. E. et al. Metabolism of 2-Acetylaminofluorene and Benzo(a)pyrene and Activation of Food-derived Heterocyclic Amine Mutagens by Human Cytochromes P-450. **Cancer Research**, v. 50, n. 11, p. 3367–3376, 1990.

MEDEIROS, I. D. et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 156–157, 2008a.

MEDEIROS, I. D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362–365, 2008b.

MELI, R. et al. Reaction of peroxynitrite with carbon dioxide: Intermediates and determination of the yield of  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  and  $\text{NO}_2^{\cdot}$ . **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 1–2, p. 31–36, 2002.

MICHAELIDIS, B. et al. Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 293, n. Lackner 2003, p. 109–118, 2005.

MICHAELIDIS, B.; HAAS, D.; GRIESHABER, M. K. Extracellular and intracellular acid-base status with regard to the energy metabolism in the oyster *Crassostrea gigas* during exposure to air. **Physiological and biochemical zoology: PBZ**, v. 78, n. 3, p. 373–83, 2005.

MOREIRA, A. et al. Native and exotic oysters in Brazil: Comparative tolerance to hypercapnia. **Environmental Research**, v. 161, n. October 2017, p. 202–211, 2018.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009.

NEBERT, D. W.; DALTON, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 12, p. 947–960, 2006.

NEGRI, A. et al. Transcriptional Response of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following Exposure to Heat Stress and Copper. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

NOGUEIRA, L. et al. Hypoxia effects on oxidative stress and immunocompetence biomarkers in the mussel *Perna perna* (Mytilidae, Bivalvia). **Marine Environmental Research**, v. 126, p. 109–115, 2017.

OLIVER, L. M. et al. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 3–4, p. 203–222, 2001.

OMURA, T. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. **Journal of Biochemistry**, v. 147, n. 3, p. 297–306, 2010.

PATEL, Y. M. et al. Metabolites of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the urine of cigarette smokers from five ethnic groups with differing risks for lung cancer. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.

PECK, L. S.; PO, H. O.; HARDEWIG, I. Metabolic Demand , Oxygen Supply , and Critical Temperatures in the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, n. 2, p. 123–133, 2002.

PEREIRA, C. D. S. et al. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1257–1264, 2011.

PEREIRA NETTO, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Quimica Nova**, v. 23, n. 6, p. 765–773, 2000.

PERKINS, E. J. **The Biology of Estuaries and Coastal Waters**. London: Academic Press., 1974.

PERNET, F. et al. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 17, p. 2999–3014, 2007.

PESSATTI, T. B. et al. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 172–180,

2016.

PIAZZA, R. S. et al. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 146–155, 2016.

PRATT, W. B. et al. Role of the Hsp90/Hsp70-Based Chaperone Machinery in Making Triage Decisions When Proteins Undergo Oxidative and Toxic Damage. v. 235, n. 3, p. 278–289, 2011.

PRITCHARD, D. W. What is an estuary: physical viewpoint. In: LAUFF, G. H. (Ed.). . **Estuaries**. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science., 1967. p. 3–5.

REGOLI, F. et al. Oxidative stress in ecotoxicology: From the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 419–423, 2002.

RINGWOOD, A. H.; KEPPLER, C. J. Water quality variation and clam growth: Is pH really a non-issue in estuaries? **Estuaries**, v. 25, n. 5, p. 901–907, 2002.

ROMANI, R. et al. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, n. 3, p. 321–329, 2003.

ROMÉO, M. et al. Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 5, p. 295–305, 2003.

SABINE, C. L. The Oceanic Sink for Anthropogenic CO<sub>2</sub>. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 367–371, 2004.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SERRANO, M. A S. et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17375–17385, 2015.

SHIRAYAMA, Y.; THORNTON, H. Effect of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on shallow water marine benthos. **Journal of Geophysical Research C: Oceans**, v. 110, n. 9, p. 1–7, 2005.

SIEBERT, M. N. et al. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 203, p. 115–121, 2017.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIMAO DO AMARAL, V.; SIMONE, L. R. L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia : Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 94, n. FEBRUARY, p. 1–26, 2014.

STARKOV, A. A. Protein-mediated energy-dissipating pathways in mitochondria (DOI:10.1016/j.cbi.2006.02.009). **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1–2, p. 133–144, 2006.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.

SU, W. et al. The health risk for seafood consumers under future ocean acidification (OA) scenarios: OA alters bioaccumulation of three pollutants in an edible bivalve species through affecting the in vivo metabolism. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 2987–2995, 2019.

SZALAJ, D. et al. The effects of ocean acidification and a carbon dioxide capture and storage leak on the early life stages of the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) and metal bioavailability. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 765–781, 2017.

TAYLOR, P.; LOGAN, D. T. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. **Human & Experimental Toxicology**, v. 13, n. 2, p. 302–316, 2007.

TOMANEK, L. et al. Proteomic response to elevated PCO<sub>2</sub> level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 11, p. 1836–1844, 2011.

VAN DER OOST, R. et al. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: Pollution-induced responses. **Aquatic Toxicology**, v. 36, n. 3–4, p. 189–222, 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281–300, 2007.

VIDAL-LIÑÁN, L. et al. Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas. **Science of the Total Environment**, v. 470–471, p. 107–116, 2014.

VRANA, B. et al. Use of semipermeable membrane devices (SPMDs). Determination of bioavailable, organic, waterborne contaminants in the industrial region of Bitterfeld, Saxony-Anhalt, Germany. **Environmental science and pollution research international**, v. 8, n. 1, p. 27–34, 2001.

WALKER, C. W. et al. **P53 Superfamily Proteins in Marine Bivalve Cancer and Stress Biology**. [s.l: s.n.]. v. 59

WANG, J. et al. Phenanthrene Metabolism in Smokers: Use of a Two-Step Diagnostic Plot Approach to Identify Subjects with Extensive Metabolic Activation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 3, p. 750–760, 2012.

WELKER, A. F. et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 165, n. 4, p. 384–404, 2013.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. 1967, p. 325–333, 1981.

WESSEL, N. et al. Effect of CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification on the early development and shell mineralization of the European abalone (*Haliotis tuberculata*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 508, n. July 2017, p. 52–63, 2018.

WILLIAMS, J. A. et al. Minireview. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 11, p. 1201–1208, 2004.

XU, C.; LI, C. Y.-T.; KONG, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug



metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 3, p. 249–68, 2005.

YAMAMOTO, T. et al. Quantitative evaluation of the effects of cold exposure of rats on the expression levels of ten FABP isoforms in brown adipose tissue. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 2, p. 237–242, 2011.

ZACCHI, F. L. et al. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 94–103, 2017.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 447–486, 2006.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196–198, 2008.

ZANETTE, J. et al. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five killifish CYP1s to the AHR agonist PCB126. **Aquatic Toxicology**, v. 93, n. 4, p. 234–243, 2009.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, out. 2012.

ZHANG, G. et al. Molecular basis for adaptation of oysters to stressful marine intertidal environments. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 2.1-2.25, 2016.

ZHONG, Y. et al. Metabolism of [ D 10 ] Phenanthrene to Tetraols in Smokers for Potential Lung Cancer Susceptibility Assessment : Comparison of Oral and Inhalation Routes of Administration. v. 338, n. 1, p. 353–361, 2011.