



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

ISIS MAYNA MARTINS DOS REIS

**A influência do sexo e estágio reprodutivo sobre biomarcadores de exposição e efeito a
pireno e fluoreno em ostras do gênero *Crassostrea***

Florianópolis

2020

Isis Mayna Martins dos Reis

**A influência do sexo e estágio reprodutivo sobre biomarcadores de exposição e efeito a
pireno e fluoreno em ostras do gênero *Crassostrea***

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

Orientador: Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

Florianópolis

2020

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

Reis, Isis Mayna Martins dos

A influência do sexo e estágio reprodutivo sobre biomarcadores de exposição e efeito a pireno e fluoreno em ostras do gênero *Crassostrea*. / Isis Mayna Martins dos Reis ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy, 2020.

112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Biomarcadores. 3. Contaminação aquática. 4. Ostras. 5. HPA. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. III. Título.

Isis Mayna Martins dos Reis

A influência do sexo e estágio reprodutivo sobre biomarcadores de exposição e efeito a pireno e fluoreno em ostras do gênero *Crassostrea*

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

Prof. Afonso Celso Dias Bairy, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Carginin Ferreira, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina

Profa. Maria Risoleta Freire Marques, Dra.
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 Doutora em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Prof. Afonso Celso Dias Bairy, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores que, mesmo em condições adversas, desenvolvem técnicas e ferramentas fundamentais para avaliar a qualidade ambiental e, por consequência, fortalecem o setor aquícola brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do doutorado, fui abençoada com o auxílio de amigos e excelentes profissionais, sem eles este trabalho não teria sido possível. Assim, expresso meus agradecimentos:

Ao Dr. Afonso Celso Dias Bainy, meu orientador desde o mestrado, agradeço a oportunidade de adquirir novos conhecimentos, de me apoiar em um estudo diferente, da confiança na minha forma de trabalho e de todos os momentos de descontração nas festinhas de final de ano.

Ao amigo Jacó Joaquim Mattos, biólogo do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola da UFSC, pelos conselhos e pela ajuda nas horas mais problemáticas.

A todos os amigos maravilhosos do LABCAI, Amanda, Bárbara, Camila, Clei, Daína, Giulia, Gui Razerra, Gui Toledo, Lígia, Luís, Luíza, Miguel, Vanessa, Vera, Thiago, Ju Moser, Karin Luchmann e Riso agradeço a ajuda, aprendizados e principalmente aos momentos de descontração na sala 93. Agradeço especialmente a Flávia e Marília, seus esforços nos experimentos foram primordiais para concretização desta tese.

Ao LMM pelo fornecimento de ostras, material e pessoal para a realização desta tese. Principalmente ao Carlos Henrique (Tatu) e ao professor Dr. Cláudio Melo, a ajuda de vocês foi imprescindível para execução do experimento do capítulo IV.

Ao secretário do programa de Pós-graduação em Aquicultura, Carlito Klunk.

Aos amigos do time Sereyos e Sereyas S.C que mantiveram a minha sanidade durante o período de doutorado. O futebol com vocês foi essencial.

Aos meus irmãos: Lisianne, Samara e Aaron por todo carinho e apoio ao longo de todos esses anos, vocês são sensacionais, amo vocês. Em especial, a minha irmã Dr^a Marilise, pelo apoio durante todo doutorado e principalmente nas leituras da tese, te amo “cotinha”. E também, aos meus cunhados queridos Atta e Tiãozinho.

Aos meus pais, pela educação privilegiada, carinho e dedicação. Obrigada pelo amor e apoio incondicional, amo vocês.

À Tamires, minha namorada, que me apoiou nos momentos mais críticos deste trabalho, sendo responsável com todo seu amor, por eu ainda seguir em frente... te amo!

À minha filha felina, Frida, que me deu alegria e distração em momentos de total exaustão.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Em Santa Catarina, parte dos cultivos de moluscos marinhos localiza-se próximo a regiões urbanizadas e podem ser impactadas por efluentes com a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre outros xenobióticos. Em bivalves, os HPAs, dentre eles, o pireno (PIR) e o fluoreno (FLU), podem promover alterações nos diversos níveis biológicos. Ostras do gênero *Crassostrea*, têm sido empregadas como organismos sentinelas em estudos de biomonitoramento ambiental, como as espécies *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas*. Contudo, são raros os estudos que utilizam esses organismos e identificam o sexo e o estágio reprodutivo associado à exposição a esses compostos. Neste estudo, biomarcadores histológicos e moleculares associado ao *status* reprodutivo de ostras *C. gasar* e *C. gigas* expostas a PIR e FLU foi investigado. Em um primeiro experimento ostras *C. gasar* foram expostas a PIR (0,25 μ M e 0,5 μ M) e FLU (0,6 μ M e 1,2 μ M) por 24 e 96h. Ostras *C. gasar* bioconcentraram mais PIR do que FLU nos tecidos e o estágio reprodutivo de pós-desova possivelmente influenciou a bioconcentração desses contaminantes. Alterações histológicas como atrofia tubular nos divertículos digestivos e aumento de células mucosas no manto foram observadas em animais expostos a PIR. A hibridização *in situ*, mostrou níveis significativos do sinal de *CYP2AUI* em diferentes tecidos de ostras expostas a PIR. Além disso, houve uma correlação positiva entre a atrofia tubular e o sinal de *CYP2AUI* nos divertículos digestivos de ostras expostas a PIR, sugerindo a susceptibilidade da espécie a este HPA. Esses resultados sugerem a utilização de biomarcadores histológicos associados ao metabolismo do PIR, mas não ao fluoreno e ainda reforça a importância do gene *CYP2AUI* no processo de biotransformação dos HPAs em diferentes tecidos de *C. gasar*. Em um segundo experimento os efeitos de biomarcadores histológicos na ostra *C. gigas* foram investigados seguindo o mesmo delineamento experimental do estudo anterior. Ostras *C. gigas* bioconcentraram PIR e FLU nos tecidos. As ostras em estágio reprodutivo de pós-desova quando expostas a PIR apresentaram atrofia tubular nos divertículos digestivos. Quando expostas a FLU as ostras *C. gigas* em estágio maduro não apresentaram alterações nos divertículos, porém mostraram aumento nas células mucosas no manto, indicando um possível mecanismo de defesa da espécie contra a exposição a esse HPA. Esses resultados sugerem que PIR e FLU causam diferentes efeitos nos tecidos das ostras *C. gigas* e que os estádios reprodutivos podem influenciar a forma como as ostras respondem à exposição aos HPAs. No terceiro experimento, o gênero das ostras foi previamente identificado através de procedimentos anestésicos. Fêmeas e machos de *C. gasar* em estágio de pré-desova foram expostos a PIR (0,25 e 0,5 μ M) por 24h. Fêmeas e machos bioconcentraram PIR em seus tecidos. Níveis de transcritos de genes de biotransformação, mecanismos de estresse e ligados à reprodução foram avaliados, mas apenas o *CYP2AUI* foi induzido em machos, assim como, alterações como a atrofia tubular foi observada em machos expostos a PIR. Esses resultados sugerem o gene *CYP2AUI* como potencial biomarcador de contaminação por HPA em *C. gasar* e destacam-se o estado reprodutivo e o sexo como fatores a serem considerados nas análises das respostas de biomarcadores em condições de laboratório. Em conclusão, considerando a necessidade de integração entre biomarcadores químicos, moleculares e histológicos e a importância do gênero e *status* reprodutivo em estudos de biomonitoramento, este trabalho mostra que, ostras *C. gasar* e *C. gigas* diferem quanto aos resultados apresentados, que o estágio reprodutivo pode influenciar na bioconcentração, nas alterações em tecidos como o divertículo e o manto nas condições experimentais apresentadas.

Palavras-chave: Aquicultura. Biomarcadores. Contaminação aquática. Ostras. HPA.

ABSTRACT

In Santa Catarina, part of marine mollusks farms is located close to urbanized regions and therefore can be impacted by effluents with the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), among other xenobiotics. In bivalves, PAH, among them, pyrene (PYR) and fluorene (FLU), can promote changes at different biological levels. Oysters of the genus *Crassostrea*, have been used as sentinel organisms in studies of environmental biomonitoring, such as the species *Crassostrea gasar* and *Crassostrea gigas*. However, studies using these organisms are rare concerning of identification of sex and reproductive behavior associated with exposure to these compounds. In this study, histological and molecular biomarkers associated with the reproductive status of oysters *C. gasar* and *C. gigas* exposed to PYR and FLU were investigated. In a first experiment oysters *C. gasar* were exposed to PYR (0.25 μM and 0.5 μM) and FLU (0.6 μM and 1.2 μM) for 24 and 96h. Oysters *C. gasar* bioconcentrated more PYR than FLU in tissues and the post-spawning reproductive stage possibly influenced the bioconcentration of these contaminants. Significant histological changes such as tubular atrophy in digestive diverticula and increased number of mucous cells in the mantle were observed in animals exposed to PYR. *In situ* hybridization showed the significant presence of *CYP2AUI* transcripts in different tissues of PYR exposed oysters. In addition, there was a positive and significant correlation between tubular atrophy and *CYP2AUI* hybridization signal of oysters exposed to PYR, suggesting susceptibility of this species to this PAH. These results suggest an important role of the use of histological biomarkers associated with PYR metabolism but not FLU and further reinforce the role of *CYP2AUI* gene in the biotransformation process of PAH in diferents tissues of *C. gasar*. A second experiment investigates the effects of histological biomarkers on oyster *C. gigas* following the same experimental design as the previous study. Oysters *C. gigas* bioconcentrated PYR and FLU in tissues. Oysters at post-spawning reproductive stage when exposed to PYR showed tubular atrophy in the digestive diverticula. When exposed to FLU, mature oysters *C. gigas* showed no alterations in diverticulum, but showed an increase of mucous cells in the mantle, demonstrating a defense mechanism of the species against exposure to this PAH. These results suggest that PYR and FLU cause different effects in tissues of *C. gigas* and that reproductive stages may potentially change the way oysters respond to PAH exposure. In the third experiment, the sex of oysters was previously identified through anesthetic procedures. Females and males of oyster *C. gasar* at pre-spawning stage were exposed to PYR (0.25 and 0.5 μM) for 24 h. Females and males bioconcentrated PYR in their tissues. Biotransformation gene levels, stress mechanisms and involved in reproduction were evaluated, but only *CYP2AUI* was induced in males, as well as tissue alterations such as tubular atrophy were only observed in males exposed to PYR. These results suggest the *CYP2AUI* gene as a potential biomarker of PYR exposure in *C. gasar* and the reproductive state and sex stand out in the analysis of biomarker responses under laboratory conditions. In conclusion, considering the need for integration molecular and histological biomarkers with chemical data and the importance of gender and reproductive status in biomonitoring studies, this work shows that oysters *C. gasar* and *C. gigas* differ in terms of the results presented, that the reproductive stage can influence bioconcentration, changes in tissues such as diverticulum and mantle in the experimental conditions presented.

Keywords: Aquaculture. Biomarkers. Aquatic contamination. Oysters. HPA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aparência externa das valvas de ostras *Crassostrea gigas* (A) e *Crassostrea gasar* (B) 17
- Figura 2:** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). Em destaque: Fluoreno e Pireno, os HPAs utilizados nesta tese. 21
- Figura 3:** Concentração de pireno (PIR) e fluoreno (FLU) medidos por fluorescência na água dos tanques com (Consumo) ostras ou sem (Depleção) ostras *Crassostrea gasar*, durante 24 h de exposição..... 36
- Figura 4:** Atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gasar* expostas aos HPAs (PIR e FLU) por 24 e 96h e grupos controle. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5:** Percentual de células mucosas no manto de ostras *C. gasar* expostas a PIR e FLU por 24 e 96h e grupos controle.. 39
- Figura 6:** Estádios de desenvolvimento gonadal de ostras *C. gasar* expostas a PIR e FLU por 24 e 96h e grupos controle.. 40
- Figura 7:** Localização de transcritos de mRNA de *CYP2AUI* por ISH em divertículo digestivo, brânquias e manto de ostras *C. gasar* expostas a duas concentrações de PIR e FLU por 24 e 96h e respectivos grupos controle.. 42
- Figura 8:** Concentração de pireno (PIR) e fluoreno (FLU) medidos por fluorescência na água dos tanques com (Consumo) ostras ou sem (Depleção) ostras *Crassostrea gigas*, durante 24 h de exposição..... 62
- Figura 9:** Atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gigas* expostas aos HPAs (PIR e FLU) por 24 e 96h e grupos controle. 64
- Figura 10:** Presença de células mucosas no manto de ostras *C. gigas* expostas a PIR e FLU por 24 e 96 h e grupos controle. 65
- Figura 11:** Estádios de desenvolvimento gonadal da ostra *C. gigas* expostas PIR e FLU por 24 e 96 h e grupos controle.. 66
- Figura 12:** Concentração de pireno (PIR) medido por fluorescência na água dos tanques com (Consumo) ostras ou sem (Depleção) de fêmeas (A) e machos (B) de *Crassostrea gasar*, durante 24h de exposição..... 86
- Figura 13:** Concentração de pireno ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos moles de fêmeas e machos de *Crassostrea gasar* em tempo zero após 24 horas de exposição. 87

| | |
|--|----|
| Figura 14: Atrofia dos túbulos digestivos de fêmeas e machos de <i>C. gasar</i> expostas a PIR por 24h e grupos controle. | 88 |
| Figura 15: Células mucosas no manto de fêmeas e machos <i>C. gasar</i> expostas a duas concentrações de PIR por 24 h e grupos controle..... | 89 |
| Figura 16: Estádios de desenvolvimento gonadal de fêmeas e machos de <i>C. gasar</i> expostas por 24 h a PIR..... | 90 |
| Figura 17: Nível de transcritos dos genes: (A) <i>CYP3475C</i> , (B) <i>CYP2-like</i> , (C) <i>CYP2AU1</i> , (D) <i>CYP356A</i> , (E) <i>GSTO-like</i> , (F) <i>MGST-like</i> , (G) <i>SULT-like</i> , (H) <i>HSP70</i> , (I) <i>Glicoproteína</i> , (J) <i>Vitelogenina</i> em brânquias de fêmeas e machos de ostras <i>C. gasar</i> de expostos a 24 h a PIR: controle (CT); PIR 0,25 µM (P1) e PIR 0,5 µM (P2)..... | 92 |
| Figura 18: Localização de transcritos de mRNA de <i>CYP2AU1</i> por ISH no manto, divertículo digestivo, brânquias e gônadas de fêmeas e machos de <i>C. gasar</i> expostas a 24 h a PIR: controle (CT); PIR 0,25 µM (P1) e PIR 0,5 µM (P2). | 94 |

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

| | |
|--|----|
| Figura Suplementar 1: Sonda sense (controle negativo da técnica) hibridizada com o mRNA sem o sinal de detecção (azul/roxo) nas brânquias (A) da ostra <i>C. gasar</i> expostas a PIR 0,5 µM (P1) por 96h e no manto da ostra <i>C. gasar</i> expostas a FLU 1,2 µM (F2) por 96h..... | 47 |
| Figura Suplementar 2: Nível de transcritos do gene <i>CYP2AU1</i> em brânquias de ostras <i>C. gasar</i> expostas a PIR (A), 0,25 µM (P1) e 0,5 µM (P2) e grupo controle e expostas a FLU (B) 0,6 µ M (F1) e 1,2 µM (F2) e grupo controle..... | 48 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração de PIR e FLU ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos moles de *Crassostrea gasar* em 24 e 96 horas de exposição: controle; pireno 0,25 μM (P1) e 0,5 μM (P2); fluoreno 0,6 μM (F1) e 1,2 μM (F2)..... 37
- Tabela 2.** Avaliação semi-quantitativa de ISH (sonda antissense) de sinal positivo (azul/roxo), segundo Henke et al., (2006) em ostras *Crassostrea gasar* expostas a duas concentrações de PIR e FLU por 24 e 96h e respectivos grupos controle..... 41
- Tabela 3.** Concentração de PIR e FLU ($\mu\text{g.g peso seco}^{-1}$) em tecidos moles de *Crassostrea gigas* em 24 e 96 horas de exposição: controle; pireno 0,25 μM (P1) e 0,5 μM (P2); fluoreno 0,6 μM (F1) e 1,2 μM (F2)..... 63
- Tabela 4.** Genes selecionados, sequência dos iniciadores, tamanho do amplicon e número de acesso do GenBank..... 83
- Tabela 5.** Avaliação semi-quantitativa de ISH (sonda antissense) de sinal positivo (azul/roxo), segundo Henke et al., (2006) em ostras *Crassostrea gasar* expostas a duas concentrações de PIR por 24 h e respectivos grupos controle. 95

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

- Tabela Suplementar 1.** Coeficiente de correlação de Sperman's entre o sinal de transcritos do *CYP2AUI* no divertículo digestivo, brânquia, manto e o grau de atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gasar* expostas a PIR..... 46
- Tabela Suplementar 2.** Coeficiente de correlação de Sperman's entre o sinal de transcritos do *CYP2AUI* no divertículo digestivo, brânquia, manto e o grau de atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gasar* expostas a FLU.. 47

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| 1.1 MALACOCULTURA: DESAFIOS E PERSPECTIVAS | 14 |
| 1.2 O CULTIVO DE OSTRAS DO GÊNERO <i>Crassostrea</i> NO BRASIL | 15 |
| 1.3 A MORFOLOGIA, O CICLO REPRODUTIVO E A TAXONOMIA DAS OSTRAS..... | 16 |
| 1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS | 20 |
| 1.5 BIOMARCADORES UTILIZADOS EM ESTUDOS DE MONITORAMENTO AMBIENTAL..... | 21 |
| 1.6 OBJETIVOS..... | 23 |
| 1.6.1 Objetivo Geral | 23 |
| 1.6.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 1.7 ESTRUTURA DO TRABALHO | 24 |
| CAPÍTULO 2 | 25 |
| 2. ARTIGO 1: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PIRENO E FLUORENO EM OSTRAS <i>Crassostrea gasar</i> DURANTE O PERÍODO REPRODUTIVO DE REPOUSO | 25 |
| 2.1 RESUMO | 26 |
| 2.2 ABSTRACT | 27 |
| 2.3 INTRODUÇÃO..... | 28 |
| 2.4 MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 2.4.1 Clonagem e sequenciamento o gene CYP450 2AU1 (<i>CYP2AU1</i>) | 29 |
| 2.4.2 Delineamento experimental | 30 |
| 2.4.2.1 <i>Coleta e aclimação das ostras</i> | 30 |
| 2.4.2.2 <i>Exposição a pireno e fluoreno</i> | 30 |
| 2.4.3 Concentração de PIR e FLU na água dos tanques | 31 |
| 2.4.4 Concentração de PIR e FLU nos tecidos moles de <i>C. gasar</i> | 32 |
| 2.4.5 Procedimentos histológicos | 32 |
| 2.4.6 Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa | 33 |
| 2.4.7 Sonda de RNA | 33 |
| 2.4.8 Hibridização <i>in situ</i> (ISH) | 34 |
| 2.4.9 Reação de qPCR | 34 |

| | | |
|-------------------------|--|-----------|
| 2.4.10 | Estatística dos dados..... | 35 |
| 2.5 | RESULTADOS | 35 |
| 2.5.1 | Concentração de PIR e FLU na água dos tanques | 35 |
| 2.5.2 | Concentração de PIR e FLU nos tecidos de <i>C. gasar</i> | 37 |
| 2.5.3 | Histologia | 37 |
| 2.5.4 | Localização dos mRNAs do <i>CYP2A1</i> | 40 |
| 2.6 | DISCUSSÃO..... | 43 |
| 2.7 | CONCLUSÃO..... | 45 |
| 2.8 | MATERIAL SUPLEMENTAR | 46 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |
| CAPÍTULO 3 | | 54 |
| 3. | ARTIGO 2: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PIRENO E FLUORENO EM OSTRAS <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1789) EM DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS. | 54 |
| 3.1 | RESUMO | 55 |
| 3.2 | ABSTRACT | 56 |
| 3.3 | INTRODUÇÃO..... | 57 |
| 3.4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 58 |
| 3.4.1 | Delineamento experimental e exposição a Pireno e Fluoreno | 58 |
| 3.4.2 | Concentração de PIR E FLU na água dos tanques..... | 59 |
| 3.4.3 | Concentração de PIR E FLU nos tecidos moles de <i>C. gigas</i> | 59 |
| 3.4.4 | Preparação dos tecidos para análise histológica..... | 60 |
| 3.4.5 | Estatística dos dados..... | 60 |
| 3.5 | RESULTADOS | 61 |
| 3.5.1 | Concentração de PIR E FLU na água dos tanques..... | 61 |
| 3.5.2 | Concentração de PIR E FLU nos tecidos de <i>C. gigas</i> | 62 |
| 3.5.3 | Histologia | 63 |
| 3.6 | DISCUSSÃO..... | 66 |
| 3.7 | CONCLUSÃO..... | 69 |
| | REFERÊNCIAS | 69 |
| CAPÍTULO 4..... | | 74 |
| 4. | ARTIGO 3: A INFLUÊNCIA DO GÊNERO SOBRE BIOMARCADORES MOLECULARES E HISTOLÓGICOS DE OSTRAS <i>Crassostrea gasar</i> MADURAS APÓS EXPOSIÇÃO A PIRENO..... | 74 |

| | | |
|--------|---|------------|
| 4.1 | RESUMO | 75 |
| 4.2 | ABSTRACT | 76 |
| 4.3 | INTRODUÇÃO..... | 77 |
| 4.4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 78 |
| 4.4.1 | Coleta, aclimação e anestesia das ostras <i>C. gasar</i> | 78 |
| 4.4.2 | Exposição a Pireno..... | 80 |
| 4.4.3 | Concentração de PIR na água dos tanques..... | 81 |
| 4.4.4 | Concentração de PIR nos tecidos moles de fêmeas e machos de <i>C. gasar</i> | 81 |
| 4.4.5 | Procedimentos histológicos..... | 81 |
| 4.4.6 | Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa | 82 |
| 4.4.7 | Reação de qPCR | 82 |
| 4.4.8 | Clonagem e sequenciamento do gene CYP450 2AU1 (<i>CYP2AU1</i>) | 84 |
| 4.4.9 | Sonda de RNA..... | 84 |
| 4.4.10 | Hibridização <i>in situ</i> (ISH)..... | 84 |
| 4.4.11 | Estatística dos dados..... | 85 |
| 4.5 | RESULTADOS | 85 |
| 4.5.1 | Concentração de PIR na água dos tanques..... | 85 |
| 4.5.2 | Concentração de PIR nos tecidos de fêmeas e machos de <i>C. gasar</i> | 86 |
| 4.5.3 | Histologia | 87 |
| 4.5.4 | Níveis de transcritos de genes..... | 91 |
| 4.5.5 | Localização dos mRNAs do <i>CYP2AU1</i> | 93 |
| 4.6 | DISCUSSÃO..... | 95 |
| 4.7 | CONCLUSÃO..... | 98 |
| | REFERÊNCIAS | 98 |
| | CAPÍTULO 5 | 105 |
| 5. | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 105 |
| | REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL..... | 107 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 MALACOCULTURA: DESAFIOS E PERSPECTIVAS

A malacocultura pode ser definida como o cultivo ou criação de moluscos para consumo humano, seja esse marinho, de água doce ou terrestre (AGUDO, 2008; ARANA, 1999). Dentro dessa atividade, destaca-se o cultivo de moluscos bivalves, animais com uma concha dividida em duas partes ou valvas como as ostras, mexilhões, vieiras e moluscos de areia. De acordo com dados da FAO (2018), os bivalves constituem 14% da produção da aquicultura mundial e representam quase 10% do total da produção pesqueira no mundo.

De fato, a produção global de moluscos bivalves (captura mais aquicultura) aumentou substancialmente nas últimas décadas, passando de quase 1 milhão de toneladas em 1950 para cerca de 16,1 milhões de toneladas em 2015 (FAO, 2018). Por espécie, a produção mundial de moluscos bivalves via aquicultura em 2015 consistiu em 38% de moluscos de areia (“*clams*”, “*cockles*” e “*ark shells*”), 35% de ostras, 14% de mexilhões e 13% de vieiras e pectínídeos (FAO, 2018). A produção dessa grande quantidade de moluscos representa uma importante atividade econômica para diversos países (MARTÍNEZ-GARCÍA *et al.*, 2019).

No Brasil, a produção de moluscos bivalves apresenta-se como uma atividade com grande potencial econômico, devido principalmente às características hídricas, geográficas e climáticas do país. O Brasil possui um litoral com o oceano Atlântico com cerca de 8400 km, que inclui regiões equatoriais, tropicais e subtropicais (RUPP; DE OLIVEIRA NETO; GUZENSKI, 2008). Apresenta uma grande diversidade de ambientes, como baías, manguezais, estuários, praias e ilhas costeiras que possibilitam o estabelecimento da malacocultura (RUPP; DE OLIVEIRA NETO; GUZENSKI, 2008).

Santa Catarina é o Estado brasileiro que possui características ideais para o cultivo de alguns moluscos bivalves. Com uma costa de 561,4 km de extensão, possui inúmeras praias de mar aberto, mas, por sua fisiografia recortada (especialmente a região centro-norte), apresenta também áreas protegidas das intempéries como baías, estuários e enseadas, o que facilita o manejo para a malacocultura (PAULILO, 2002). Esse é um dos motivos pelo qual o cultivo de moluscos bivalves é uma das atividades econômicas de maior destaque nesse Estado.

A produção nacional de ostras, mexilhões e vieiras é quase exclusividade do litoral catarinense (IBGE, 2019). De acordo com a Produção da Pecuária Municipal (PPM) do IBGE, foram produzidas mais de 20.000 t em 2016, o que corresponde a 98% da malacocultura brasileira. Por outro lado, essa região sofre crescentes pressões antropogênicas, dado o crescimento demográfico e a litoralização das populações concentradas em grandes aglomerados urbanos (RUPP; DE OLIVEIRA NETO; GUZENSKI, 2008). Por essa razão, a contaminação nas águas de cultivo já é uma realidade para Santa Catarina. Muitas das fazendas de cultivo estão assentadas em baías que recebem periodicamente efluentes de rios, águas pluviais de vias de tráfego e esgoto clandestino, reconhecidas fontes poluidoras (DOS REIS, 2014; FLORES-NUNES, 2008; LÜCHMANN, 2012).

A presença da poluição por contaminação biológica (coliformes fecais ou patógenos presentes em efluentes domésticos), por eutrofização (excesso de nutrientes e microalgas), química (hidrocarbonetos, metais pesados, agrotóxicos, fenóis e resíduos de indústrias), pode limitar o desenvolvimento dos bivalves dependendo da sua concentração e também inviabilizar a sua comercialização pela alta carga de contaminantes concentrados na carne (MARENZI, CASTILHO-WESTPHAL, 2011). Em decorrência desses fatores, em 2017 a produção de moluscos teve uma redução de 11% (13.699 t) em relação ao ano anterior (EPAGRI, 2017).

Em vista disso, destacam-se duas perspectivas: uma que evidencia o crescimento da malacocultura no Estado de Santa Catarina, outra que, em paralelo, requer atenção em virtude das consequências para o cultivo dado o aumento demográfico e a litoralização da população catarinense. Posto isso, faz-se necessária a busca por programas e ferramentas de monitoramento da zona costeira e parques aquícolas, além de um maior investimento dos órgãos públicos em saneamento, com vistas à preservação desses ambientes para a aquicultura.

1.2 O CULTIVO DE OSTRAS DO GÊNERO *CRASSOSTREA* NO BRASIL

O cultivo de ostras tem uma história recente no Brasil, com várias tentativas de implantação nas décadas de 1970 e 1980. No Estado de Santa Catarina pode-se afirmar que a atividade foi consolidada apenas no início dos anos 1990, início de uma nova atividade econômica com a mudança do perfil socioeconômico das comunidades costeiras (RUPP; DE OLIVEIRA NETO; GUZENSKI, 2008). Essa atividade também ocasionou uma maior conscientização ambiental por parte dos aquicultores, principalmente no que se refere à

importância das águas limpas para o cultivo de moluscos e a maior segurança alimentar para o consumo.

Atualmente, no Brasil, as principais espécies de ostras cultivadas são pertencentes ao gênero *Crassostrea*: uma espécie exótica, a ostra do Pacífico *C. gigas*, cultivada na região Sul (estado de Santa Catarina); as ostras nativas *C. rhizophorae* (Guilding, 1828) e a *C. gasar* (Adanson, 1757), cultivadas nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (RAMOS, 2018). As ostras pertencentes a esse gênero apresentam maior importância econômica devido ao valor alimentício da “carne” e do uso da concha como matéria prima na fabricação de produtos industriais (e.g., fabricação de blocos de concreto para pavimentos) (SAIKIA; DE BRITO, 2012), farmacêuticos (e.g., uso do carbonato de cálcio para remédios da osteoporose) (HAMESTER; BALZER; BECKER, 2012) e, também, por possuírem elevado valor proteico (WAKAMATSU, 1973).

No que se refere aos municípios produtores de ostras no estado de Santa Catarina, destacaram-se no ano de 2017: Florianópolis (1.778 toneladas); Palhoça (432 toneladas) e São José (250 toneladas) (EPAGRI, 2017). Para suprir a demanda do cultivo de moluscos bivalves em Santa Catarina, o Estado conta com a produção de sementes que é realizada pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Além da produção de larvas do mexilhão *P. perna* e produção de sementes de ostras nativas, o laboratório produz sementes da ostra do Pacífico *C. gigas* para todo o estado (PUCHNICK-LEGAT, 2015). A ostra *C. gigas* destaca-se na produção catarinense, o cultivo dessa espécie corresponde a 90% da ostreicultura brasileira (LEGAT, 2015).

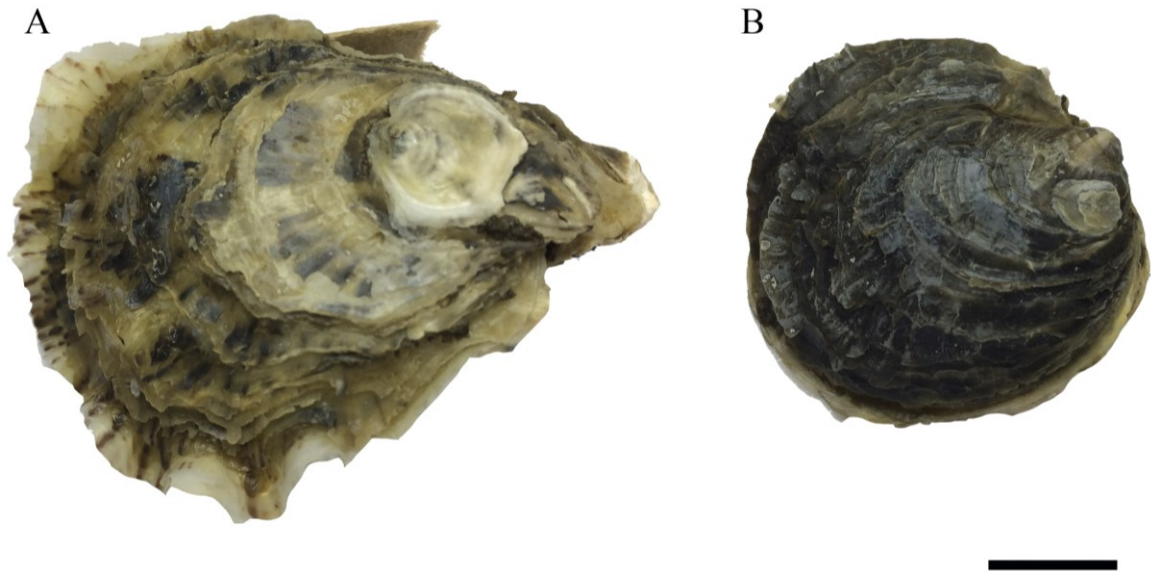
Apesar de *C. gigas* ser a ostra mais cultivada no Brasil, ambas as espécies *C. gigas* e *C. gasar* apresentam ampla tolerância para salinidade e temperatura, são sésseis e filtradoras e caracterizam-se por habitar regiões estuarinas e de manguezais (GOSLING, 2003; LOPES, 2008). Esses animais desempenham um papel importante na dinâmica dos sedimentos, nutrientes e algas nos estuários em regiões entre marés (SALVI; MACALI; MARIOTTINI, 2014). Entretanto, como essas regiões recebem um grande aporte de contaminantes antropogênicos, aumenta também o contato desses animais com esses compostos.

1.3 A MORFOLOGIA, O CICLO REPRODUTIVO E A TAXONOMIA DAS OSTRAS

As ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) são chamadas de “*cupped oysters*” que, em português seria “ostras-taça”, por causa do formato côncavo característico da valva inferior (ALVES, 2004). Sua concha apresenta um alto grau de plasticidade morfológica,

podendo ter uma gama muito grande de formatos e tamanhos, fortemente influenciados pelo substrato. A coloração externa é variável, predominando tons esbranquiçados, com nuances de vermelho, azul, violeta ou preto, não tendo um padrão definido (Figura 1) (ALVES, 2004).

Figura 1: Aparência externa das valvas de ostras *Crassostrea gigas* (A) e *Crassostrea gasar* (B).
Barra: 1 cm.



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O manto das ostras consiste em uma camada de tecido que envolve completamente os órgãos internos dentro da concha, ou seja, as partes moles de ambos os lados do corpo. Um espaço mínimo, que contém fluido palial, separa o manto da concha, exceto nas regiões de fixação muscular (GOSLING, 2003). O manto possui células responsáveis pela deposição de carbonato de cálcio e formação da concha, bem como células com função sensorial (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). A borda do manto é composta por três lobos: um mais interno, chamado de lobo palial, provido de tentáculos; um lobo médio, denominado sensorial, também recoberto por tentáculos; e o lobo externo, responsável pela formação da concha, sendo que o lobo interno (palial) no manto das ostras é o tecido que tem o primeiro contato com a água do ambiente (GALTSOFF, 1964). Quanto à superfície interior do manto, esta é composta por colágeno, células ciliadas e células secretoras de muco (mucócitos) que se dedicam ao acúmulo e transporte dos rejeitos da cavidade do manto (COAN *et al.*, 2000). O muco secretado pela ostra participa da captação de alimento, sendo também uma via de incorporação de contaminantes (MARIGOMEZ *et al.*, 2002).

As brânquias têm um papel fundamental na respiração e na filtração de alimento nas ostras. Sua extensa área de superfície e seu rico suprimento de hemolinfa tornam a brânquia

um órgão ideal para trocas gasosas. Apesar do sistema circulatório das ostras ser aberto, a hemolinfa circula por filamentos (tubos ocos) que banham diretamente os tecidos em um processo relativamente simples (GOSLING, 2003). A hemolinfa desoxigenada é transportada dos rins para as brânquias por meio da veia branquial aferente, onde cada filamento branquial recebe um pequeno ramo desta veia. Já a hemolinfa oxigenada de cada filamento é coletada na veia branquial eferente que vai para o rim e o coração. Toda a troca gasosa ocorre através das finas paredes desses filamentos (GOSLING, 2003). Já em relação à filtração de alimentos, as partículas de detritos e os micro-organismos presentes na água do mar são capturados por filamentos branquiais e conduzidos por meio de batimentos ciliares até o palpo labial, onde são separadas as partículas de alimento das partículas minerais e transportado o alimento para a boca (BARNABÉ, 1996). Nesse processo as brânquias acabam incorporando diversos contaminantes dissolvidos na água como: pesticidas, metais pesados e hidrocarbonetos (GOSLING, 2003).

O divertículo digestivo das ostras consiste em lóbulos irregulares com coloração verde-acastanhado, ou preto, formado por terminações cegas que juntamente com o esôfago e o estômago constituem a massa visceral ovóide. Apresentam túbulos que se conectam ao estômago por vários dutos ciliados e é o local onde ocorre a digestão intracelular. Os túbulos são compostos por dois tipos de células, as células digestivas e as células basófilas (secretórias) (GOSLING, 2003; SHAW; BATTLE, 1957). As células digestivas absorvem material por pinocitose e as digerem dentro de vacúolos. Os produtos finais da digestão são absorvidos pelo sistema (MATHERS, 1972) e os resíduos são retidos em corpos residuais ligados à membrana, que são posteriormente liberados no lúmen dos túbulos. Os resíduos liberados e encapsulados em esferas excretoras são varridos para o estômago e, finalmente, para o intestino. Os resíduos também podem conter enzimas digestivas que podem ser utilizadas pelo estômago para digestão extracelular. O divertículo digestivo está diretamente relacionado à eliminação de xenobióticos, funções endógenas de regulação do metabolismo e fornecimento de energia durante o processo de gametogênese e estresse fisiológico (MARIGOMEZ; LEKUBE; CANCIO, 1999).

A gônada cobre a superfície externa do divertículo digestivo, e quando a ostra está madura (*e.g. C. gigas*) a gônada costuma ter 6 a 8 mm de espessura e pode compreender um terço do peso corporal total, excluindo a concha (GOSLING, 2003). As ostras, como outros bivalves marinhos, têm ciclos reprodutivos que envolvem períodos de produção de gametas, desova, fecundação, desenvolvimento larval, assentamento, metamorfose e crescimento até a maturidade sexual (PUCHNICK-LEGAT, 2015). Diferente de outras espécies que apresentam

dimorfismo sexual, o que facilita a identificação do sexo macroscopicamente, ostras do gênero *Crassostrea*, em sua maioria, são organismos hermafroditas sequenciais, sendo a gônada primária bissexual (GALTSOFF, 1964; RAMOS, 2018). Geralmente maturam primeiro como machos, passando em seguida a produzir oócitos, podendo, eventualmente, voltar a produzir espermatozoides (GALTSOFF, 1964). A maioria dos juvenis alcança a maturidade sexual antes de atingir os 30 mm de altura, aproximadamente 120 dias após a fixação (VÉLEZ, 1976; NASCIMENTO; PEREIRA; SOUZA, 1980).

No Brasil, o período reprodutivo da ostra *C. gasar* difere entre as regiões Sul, Sudeste e Norte (LEGAT, 2015). Em Santa Catarina, o estágio de pré-desova foi observado em indivíduos cultivados, entre os meses de novembro e dezembro, quando ocorre uma maior predominância de fêmeas aptas à liberação de gametas (GOMES *et al.*, 2014). Em relação à *C. gigas* cultivada em Santa Catarina, a espécie elimina gametas preferencialmente no final da primavera, em novembro e, secundariamente em março, no final do verão, período em que a temperatura da água varia de 26 a 30°C (PUCHNICK-LEGAT, 2015). Nessa época é possível observar animais com mais de 50% do corpo coberto por tecido com capacidade reprodutiva, sendo que ostras adultas podem produzir entre 50 e 200 milhões de ovócitos em uma única desova (SHATKIN; SHUMWAY; HAWES, 1998; FAO, 2018).

A fim de evitar o sacrifício de animais para avaliação do período reprodutivo, técnicas de anestesia têm sido empregadas com sucesso para minimizar o estresse no manuseio, reduzir as mortalidades relacionadas à pesquisa (BUTT *et al.*, 2008) e também para facilitar biópsias de tecido e estudos de gametogênese individual (PUCHNICK-LEGAT, 2015; SUQUET *et al.*, 2009).

Outro aspecto importante é a distinção entre as espécies de ostras do gênero *Crassostrea*. Muitas vezes podem ocorrer erros na classificação, pois faltam caracteres conchológicos que permitam uma distinção confiável entre as espécies de ostras. A partir dos anos 1990 se tornou fundamental o uso de marcadores moleculares para elucidar a taxonomia das espécies que, desde então, vem sendo utilizado como subsídio à conservação e manejo dos estoques naturais (WANG; XU; GUO, 2004; REECE *et al.*, 2008; PUCHNICK-LEGAT, 2015).

No presente estudo, procedimentos anestésicos foram utilizados para identificação sexual das ostras, cujos procedimentos estão descritos no capítulo 4.

Para as espécies-alvo deste estudo, o grupo taxonômico obedece a descrição do Sistema de Informação Taxonômica Integrado (ITIS, “Integrated Taxonomic Information System”; <http://www.itis.gov/index.html>).

Filo Mollusca

Classe Bivalvia (Linnaeus, 1758)

Sub-Classe Pteriomorpha (Beurlen, 1944)

Ordem: Ostreoida

Família Ostreidae (Rafinesque, 1815)

Gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897)

Espécie *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757)

Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)

1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

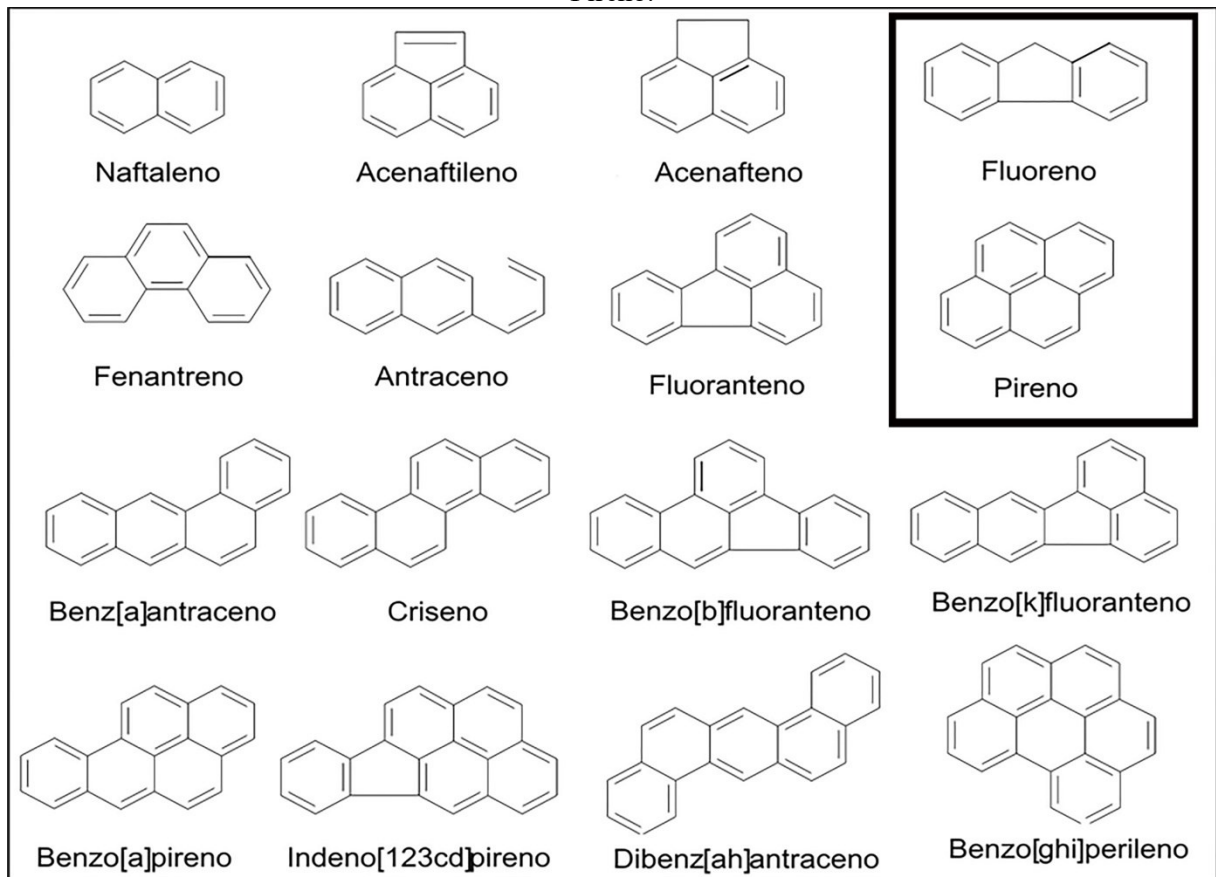
Devido à sua toxicidade e onipresença no ambiente aquático, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados poluentes prioritários (MARTINS *et al.*, 2015), possuem dois ou mais anéis de benzeno fusionados (Figura 2) e compõem um grupo de substâncias que constitui o petróleo (DOUBEN, 2003). São utilizados em plásticos, combustíveis, tintas, asfalto e em processos industriais, como produção de fármacos e pesticidas (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015). Esses compostos são conhecidos por serem imunotóxicos, teratogênicos e carcinogênicos, o que representa riscos para a saúde humana (EFSA, 2008; MARTINS *et al.*, 2015).

Devido a essas características, os HPAs estão listados nas regulamentações e legislações ambientais de diversos países como uma classe de contaminantes de alta prioridade em risco ecológico de efluentes. As principais legislações que abordam detalhadamente as quantidades de HPAs na água e sedimento estão vigentes nos Estados Unidos, por meio da Agência de Proteção Ambiental (United States Environmental Protection Agency - US EPA) (EPA, 2008) e na União Europeia (EU, 2011).

Os HPAs estão comumente presentes no ambiente marinho como misturas. Entretanto, como compostos individuais possuem diferentes mecanismos de toxicidade, independentemente de similaridades químicas entre as classes (MAYER; REICHENBERG, 2006, MARTINS *et al.*, 2015). Fluoreno, um HPA formado por três anéis de benzeno, está presente na maioria dos tipos de petróleo e é um composto químico amplamente utilizado na produção de pigmentos, corantes, pesticidas, plásticos e na indústria farmacêutica (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016; MUANGCHINDA *et al.*, 2017). Por esse motivo, é um hidrocarboneto comumente detectado em ambientes aquáticos e sedimentos de ambientes marinhos e de água doce (ALEGBELEYE; OPEOLU; JACKSON, 2017; MUANGCHINDA

et al., 2017). Já o pireno é composto por quatro anéis e é modelo em estudos de degradação biológica e biotransformação de HPA (BEACH; HELLOU, 2011; RAVELET *et al.*, 2000). Compostos como o pireno e fluoreno resistem à biodegradação e tendem a persistir no sedimento, água, solo, material particulado atmosférico e em alguns organismos, como os bivalves (MAIOLI *et al.*, 2010). Assim, o estudo de cada um desses contaminantes individualmente permite elucidar mecanismos de ação dessas moléculas e prever efeitos em nível de organismo, população ou até mesmo de ecossistemas.

Figura 2: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). Em destaque aqueles utilizados nesta tese: Fluoreno e Pireno.



Fonte: MEIRE; AZEREDO; TORRES (2008).

1.5 BIOMARCADORES UTILIZADOS EM ESTUDOS DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

A exposição constante da biota aquática às substâncias tóxicas lançadas no ambiente, como os HPAs, leva à interação com o organismo vivo causando múltiplas alterações que podem gerar graves consequências em populações, comunidades ou ecossistemas, o que

provoca uma intensa preocupação de monitorar a presença desses contaminantes no ambiente marinho (JESUS; CARVALHO, 2008; DOMINGOS, 2006). Esse estudo de avaliação do ambiente aquático é realizado, em geral, através de programas de biomonitoramento onde é possível identificar e acompanhar impactos antropogênicos em determinadas áreas, ao longo do tempo (DOMINGOS, 2006).

O uso de biomarcadores tem sido empregado como uma ferramenta promissora para a detecção preventiva de efeitos adversos no ambiente aquático. Biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas adaptativas a contaminantes químicos, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (JESUS; CARVALHO, 2008; WALKER *et al.*, 2012). Podem, no entanto, ser classificados como biomarcadores de exposição, efeito ou suscetibilidade (JESUS; CARVALHO, 2008).

Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um contaminante (JESUS; CARVALHO, 2008). Um exemplo de biomarcadores de exposição são as variações em níveis de transcritos de genes de biotransformação, que são estudadas como biomarcadores moleculares da contaminação de HPAs em bivalves (GUO *et al.*, 2017; JENNY *et al.*, 2016; WAN *et al.*, 2009). Entre os indicadores mais investigados nesses animais aquáticos estão as alterações nos níveis de transcritos de genes de biotransformação de fase I (e.g. *CYP2A1*) e fase II (e.g. GST e SULT) e sugerem o uso dos níveis de transcritos desses genes como biomarcadores moleculares de exposição aos HPAs (LUCHMANN, 2012; PIAZZA *et al.*, 2016; DOS REIS *et al.*, 2015; ZACCHI *et al.*, 2019). Esses biomarcadores tem se demonstrado muito sensíveis e específicos em ostras expostas a diferentes HPAs.

Já os biomarcadores de efeitos, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação (JESUS; CARVALHO, 2008). Os biomarcadores de efeito (e.g. histológicos) permitem identificar alterações e a modificação de parâmetros fisiológicos (e.g. o conteúdo de proteínas, lipídios, glicogênio, etc.) em organismos expostos a um contaminante (HINTON *et al.* 1992). Por isso, a histologia é utilizada em análises do efeito de xenobióticos sobre organismos aquáticos (LINS *et al.*, 2010).

Em estudos de biomonitoramento ambiental recomenda-se a utilização de diferentes biomarcadores, uma vez que apenas a avaliação de uma única resposta biológica pode não refletir de maneira ampla e complementar os danos na saúde dos organismos de determinado

ambiente impactado (ZORITA *et al.*, 2008). Por essa razão, variações em níveis de transcritos de genes de biotransformação e alterações teciduais são estudadas como biomarcadores moleculares e histológicos da contaminação de HPAs em bivalves, respectivamente (XIU *et al.*, 2015; XIU; PAN; JIN, 2016; DOS REIS *et al.*, 2015; ZACCHI *et al.*, 2019).

Os bivalves (dentre eles, a ostra) respondem negativamente aos xenobióticos, com diminuição da taxa e do potencial de crescimento (SINDERMANN, 1996), e por isso têm sido extensivamente utilizados como sentinelas para monitorar (biomonitores) a entrada/presença de contaminantes em ambientes marinhos e de estuários (NOAA, 1993; O'CONNOR; BELIAEFF, 1995). Além disso, esses organismos são sésseis e se alimentam por filtração, características que lhes permitem bioacumular produtos químicos em altas concentrações, inclusive acima dos níveis encontrados na água circundante (OLIVER, *et al.*, 2001). No Brasil, as ostras do gênero *Crassostrea* têm sido empregadas com sucesso como organismos sentinelas em estudos de biomonitoramento, como as espécies nativas *C. gasar* e *C. rhizophorae* e a exótica *C. gigas* (DOMINGOS, 2006; FLORES-NUNES, 2008; PESSATI *et al.*, 2016; ZANETTE, 2009).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito do *status* reprodutivo e do gênero sobre biomarcadores de exposição e efeito a pireno e fluoreno em ostras *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas*.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do estágio reprodutivo nas respostas moleculares e histológicas das ostras *C. gasar* e *C. gigas* expostas a pireno e fluoreno.
- Avaliar as alterações histológicas em diferentes órgãos de ostras *C. gasar* e *C. gigas* expostas a pireno e fluoreno em diferentes períodos de exposição (24 e 96 h).
- Identificar qual dessas espécies de ostras é mais responsiva a pireno e/ou fluoreno.

- Avaliar as alterações histológicas e as respostas transcricionais de genes relacionados com o sistema de biotransformação, de estresse e reprodução em fêmeas e machos de *C. gasar* expostas a pireno.
- Identificar a localização dos transcritos do gene-alvo *CYP2AUI* em diferentes órgãos da ostra *C.gasar* expostas a pireno e fluoreno.
- Contribuir na busca de potenciais biomarcadores moleculares e histológicos de contaminação por pireno e fluoreno.
- Fornecer informações sobre possíveis efeitos interferentes relacionados ao sexo e estágio reprodutivo sobre potenciais biomarcadores de exposição a pireno e fluoreno que possam ser utilizadas em programas de biomonitoramento da contaminação de regiões costeiras e parques aquícolas.

1.7 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este documento está organizado em cinco capítulos. O primeiro capítulo que finaliza nesta seção, contém uma breve revisão bibliográfica de temas abordados nesta tese de doutorado e objetivos propostos. O capítulo 2 apresenta os resultados dos efeitos da exposição a pireno e fluoreno em ostras *Crassostrea gasar* durante o período reprodutivo de repouso, publicado na revista *Aquatic Toxicology*. O terceiro capítulo apresenta os resultados da exposição aos mesmos HPAs do Capítulo 1, entretanto, a exposição foi realizada em ostras da espécie *Crassostrea gigas* em diferentes estádios reprodutivos. A partir dos dados deste capítulo foi gerado um artigo submetido na revista *Aquatic Toxicology*. No capítulo 4 estão apresentados os resultados da investigação das diferenças do gênero no metabolismo de ostras *Crassostrea gasar* maduras expostas a pireno. A escolha da espécie e do HPA, relatado no capítulo 4 foi baseada a partir dos resultados obtidos no capítulo 2 e 3. Por fim, o capítulo 5 apresenta as considerações finais do trabalho desenvolvido. As referências de todos os capítulos estão organizadas em ordem alfabética no final do documento.

CAPÍTULO 2

2. ARTIGO 1: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PIRENO E FLUORENO EM OSTRAS *CRASSOSTREA GASAR* (ADANSON, 1757) DURANTE O PERÍODO REPRODUTIVO DE REPOUSO.

*Flávia Lucena Zacchi*¹; *Isis Mayna Martins dos Reis*¹; *Marília Nardelli Siebert*¹; *Jacó Joaquim Mattos*²; *Fabício Flores-Nunes*¹; *Guilherme de Toledo-Silva*³; *Clei Endrigo Piazza*¹; *Márcia Caruso Bicego*⁴; *Satie Taniguchi*⁴; *Afonso Celso Dias Bainy*¹

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

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

³Laboratório de Bioinformática, Departamento de Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Laboratório de Química Orgânica Marinha - LABQOM, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.

Capítulo publicado na revista **Aquatic Toxicology** em 2019, juntamente com os dados apresentados na tese da doutoranda Flavia Lucena Zacchi do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC. Zacchi, F.L., dos Reis, I.M.M, Siebert, M.N.,Mattos, J.J, Flores-Nunes, F.F., Toledo-Silva, G., Piazza, C.E., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Bainy, A.C.D., 2019. **Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - Part I.** *Aquat. Toxicol.*, 216, 1-15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105318>

2.1 RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos por dois ou mais anéis de benzeno e constituem uma classe de compostos poluentes orgânicos altamente distribuídos no ambiente marinho. A exposição aos HPA causa riscos à saúde animal devido ao seu potencial carcinogênico, mutagênico e/ou teratogênico. Dependendo da estrutura química do HPA, concentração e período de exposição, danos biológicos podem ocorrer em níveis mais altos, levando a alterações histopatológicas nos organismos. Com o objetivo de avaliar o impacto na estrutura tecidual das ostras e assim identificar quaisquer biomarcadores histológicos úteis relacionados à sua exposição, ostras *Crassostrea gasar* foram expostas a pireno (0,25 μM e 0,5 μM) e fluoreno (0,6 μM e 1,2 μM) por 24 e 96h. A concentração dos HPAs foi quantificada na água e nos tecidos. Além disso, foram avaliados os níveis de localização do gene *CYP2A1* por ISH (hibridização *in situ*) e qPCR. Ostras bioconcentraram mais pireno e esse resultado pode estar relacionado à maior lipofilicidade desse HPA. Alterações histológicas significativas, como atrofia tubular nos divertículos digestivos e aumento do número de células mucosas no manto, foram observadas em animais expostos a pireno. A ISH mostrou a presença significativa de transcritos de *CYP2A1* em diferentes tecidos de ostras expostas a pireno. Foi observada uma correlação positiva e significativa entre a atrofia tubular e o sinal de hibridização do *CYP2A1* nos divertículos digestivos de ostras expostas a pireno, sugerindo a susceptibilidade da espécie a este HPA. Estes resultados sugerem um papel importante da utilização de biomarcadores histológicos associados ao metabolismo do pireno, mas não ao fluoreno nessa espécie. Além disso, reforça o papel do gene *CYP2A1* no processo de biotransformação dos HPAs em diferentes tecidos de *C. gasar*.

Palavras-chave: ostra do mangue, HPA, histologia, qPCR, ISH.

2.2 ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are composed of two or more benzene rings and are a class of highly distributed organic pollutants in marine environments. PAHs can affect organisms due to their carcinogenic, mutagenic and/or teratogenic characteristics. Depending on the PAHs, concentration, and period of exposure, biological damage can occur leading to histopathologic alterations. In order to assess the impact on oyster tissue structure and thus identify any useful histological biomarkers related to their exposure, oysters *Crassostrea gasar* were exposed to pyrene (0.25 and 0.5 μM) and fluorene (0.6 and 1.2 μM), after exposure for 24 and 96 h. Concentrations of both PAHs were quantified in the water and in oyster tissues. In addition, levels of *CYP2AUI* gene transcripts were evaluated by ISH (*in situ* hybridization) and qPCR. Oysters bioconcentrated more pyrene and this result may be related to the higher lipophilicity of this PAH. Tubular atrophy in the digestive diverticula and an increased number of mucous cells in the mantle were observed in oysters exposed to pyrene. *CYP2AUI* transcripts were observed in different tissues of pyrene exposed oysters. A significant correlation was observed between tubular atrophy and the *CYP2AUI* hybridization signal in oysters exposed to pyrene, suggesting the sensibility of the species to this PAH. These results suggest an important role of the use of histological biomarkers associated with pyrene metabolism, but not fluorene in this species. In addition, it reinforces the role of *CYP2AUI* gene in the biotransformation process of PAHs in different tissues of *C. gasar*.

Keywords: mangrove oyster, PAH, histology, qPCR, ISH.

2.3 INTRODUÇÃO

A contaminação dos ecossistemas estuarinos e marinhos tem crescido nos últimos anos devido ao lançamento de diversas substâncias químicas potencialmente tóxicas de origem natural ou antrópica (Cajaraville et al., 2016; Frena et al., 2017). Muitas dessas substâncias químicas são decorrentes do escoamento de fontes não pontuais, consideradas um dos meios mais complexos e poluidores do ambiente marinho (Vikas e Dwarakish, 2015; Weinstein, 1997).

As fontes denominadas não pontuais são aquelas provenientes do escoamento superficial urbano ou rural, a partir de diversos geradores de resíduos que são carreados até os corpos d'água (Moura e Lima, 2018). Considera-se que cerca de 80% da poluição dos oceanos é proveniente do escoamento terrestre oriundo de pequenas fontes como fossas sépticas, carros, caminhões e barcos ou grandes fontes como fazendas, ranchos e áreas florestais (Vikas e Dwarakish, 2015). Estudos sugerem que o escoamento de fontes não pontuais são o principal meio de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em estuários urbanizados (Uri e Schiffman, 2014; Weinstein, 1997; NOAA, 2007). Portanto, o monitoramento contínuo da poluição por HPAs e a identificação de suas possíveis fontes são centrais na manutenção da saúde ambiental do ecossistema marinho (Puy-Azurmendi et al., 2010).

HPAs são contaminantes ambientais de ampla ocorrência, conhecidos por seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos, o que representa uma preocupação para a saúde humana (EFSA, 2008; Maioli et al., 2010). O fluoreno, um HPA formado por três anéis de benzeno, está presente na maioria dos tipos de petróleo e é um composto químico amplamente utilizado na produção de pigmentos, corantes, pesticidas e plásticos e na indústria farmacêutica (Abdel-Shafy e Mansour, 2016; Muangchinda et al., 2017). Por esse motivo, é um hidrocarboneto comumente detectado em ambientes aquáticos e em sedimentos de ambientes marinhos e de água doce (Alegbeleye et al., 2017; Muangchinda et al., 2017). Já o pireno é composto por quatro anéis, e é modelo em estudos de degradação biológica e biotransformação de HPA (Beach and Hellou, 2011; Ravelet et al., 2000). Compostos como o pireno e fluoreno são mais resistentes à biodegradação e tendem a persistir no sedimento, água, solo, material particulado atmosférico e em alguns organismos, como os bivalves (Maioli et al., 2010).

Moluscos bivalves, incluindo espécies de mexilhões e ostras, têm a capacidade de sobreviver em tais águas poluídas (Au, 2004), no entanto, níveis elevados desses poluentes

podem sobrecarregar mecanismos fisiológicos normais de biotransformação e desintoxicação (Weinstein, 1997). Diante disso, a sobrevivência prolongada desses animais sob condições adversas pode levar a distúrbios fisiológicos severos na estrutura celular e pode aumentar a suscetibilidade de um indivíduo a infecções, doenças e parasitas (Sindermann, 1980).

Diversos estudos relatam alterações celulares causadas por exposição aos HPAs, como a atrofia ou "desbaste" do epitélio tubular digestivo em mexilhões (Al-Subiai et al., 2012; Bignell et al., 2011; Cajaraville et al., 2016; Cuevas et al., 2015; Weinstein, 1997) e em ostras (Aguirre-Rubí et al., 2018; dos Reis et al., 2015). Um aumento no percentual de células mucosas no manto e brânquias de bivalves (David et al., 2008; dos Reis et al., 2015; Speciale et al., 2018; Valdez Domingos et al., 2007) também tem sido associado a uma resposta de defesa contra o estresse ambiental causado pela exposição aos HPAs. Esses resultados indicam que a exposição a hidrocarbonetos perturba processos morfológicos, que por sua vez podem levar a uma redução do crescimento, da taxa reprodutiva e, conseqüentemente, da sobrevivência desses organismos (Moore et al., 1987, 1984; Weinstein, 1997; Widdows et al., 1982). Em ostras *Crassostrea gasar* expostas ao HPA fenantreno foram observadas alterações bioquímicas e moleculares em diferentes genes de biotransformação (Lima et al., 2018; Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2018, 2017) e a localização do gene *CYP2A1*, por meio da técnica de hibridização *in situ* (ISH), em diversos tecidos (dos Reis et al., 2015). Nesses trabalhos, o potencial uso da transcrição do gene *CYP2A1* como biomarcador molecular de exposição à HPAs foi evidenciado.

Neste estudo, ostras *C. gasar* foram expostas a duas concentrações de pireno e fluoreno, em condições de laboratório, com o objetivo de avaliar seu impacto sobre a estrutura tecidual das ostras e, assim, identificar biomarcadores histológicos úteis relacionados a exposição. Além disto, foram analisados os níveis de transcrição e localização do gene *CYP2A1* por qPCR e ISH, respectivamente, e a bioconcentração desses contaminantes na água e nos tecidos.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Clonagem e sequenciamento o gene *CYP450 2AU1 (CYP2A1)*

Para a análise de hibridização *in situ*, o gene *CYP450 2AU1 (CYP2A1)* foi escolhido, uma vez que em um estudo anterior (dos Reis et al., 2015) foi observado um intenso sinal desse gene em diversos tecidos da ostra *C. gasar* exposta a fenantreno. O cDNA

foi sintetizado utilizando o kit Omniscript™ Reverse Transcriptase (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Os procedimentos de clonagem e síntese dos iniciadores para a reação de PCR estão descritos em dos Reis et al. (2015). O produto de PCR foi clonado em um vetor pCRII-TOPO (kit de clonagem TOPO®TA Dual Promoter, Invitrogen, Carlsbad). O plasmídeo foi sequenciado utilizando um sistema ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Califórnia) para confirmar a sequência do gene e a orientação dos locais T7 e SP6. O plasmídeo contendo o produto de PCR de 672 pb foi purificado utilizando o kit Plasmid Midi (Qiagen) para a síntese da sonda de RNA.

2.4.2 Delineamento experimental

2.4.2.1 Coleta e aclimação das ostras

Ostras do mangue *Crassostrea gasar* de $6,4 \pm 0,7$ cm de altura (Galtsoff, 1964), de mesmo lote e condições de manejo foram adquiridas em um cultivo comercial localizado no Ribeirão da Ilha, em Florianópolis, Santa Catarina, Sul do Brasil, e transportadas até o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC). Um total de duzentas e dezesseis ostras foram utilizadas neste experimento. Para a exposição a Pireno, ostras ($n=108$) foram aclimatadas durante sete dias em tanques de 150L, em sistema de recirculação contínua e mantidas sob condições controladas em água com salinidade (25 ‰), temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1,1^{\circ}\text{C}$), pH ($7,8 \pm 0,1$), amônia ($<0,25$) e fotoperíodo (12h:12h). Durante todo o período de aclimação, a cada 36 h, foram alimentadas com ração comercial de microalgas Microbe Lift Phyto Plus-B, na concentração de $200 \cdot 10^6$ células.ostra⁻¹. O sistema de recirculação era desligado, a ração adicionada e, após 2 h, o sistema era religado. Após uma semana o mesmo desenho experimental da aclimação foi utilizado para aclimatar 108 ostras, para a exposição ao fluoreno.

2.4.2.2 Exposição a pireno e fluoreno

Ao final do período de aclimação, ostras foram alimentadas por 2h e transferidas para 18 tanques contendo 18L de água cada (seis animais por tanque) para a exposição ao pireno. Pireno (98% de pureza, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado aos tanques de exposição até alcançar as concentrações nominais de pireno. Ostras

foram expostas em triplicata da seguinte forma: Para 24h de exposição – três tanques controle, três tanques contendo pireno a 0,25 μM (P1) e três tanques contendo pireno a 0,5 μM (P2); para 96h de exposição – três tanques controle, três tanques contendo pireno a 0,25 μM (P1) e três tanques contendo pireno a 0,5 μM (P2). No grupo controle, 0,002% (concentração final) de DMSO foi adicionado.

O mesmo desenho experimental foi utilizado para a exposição ao fluoreno, que foi realizado uma semana depois da exposição ao pireno. Ostras foram expostas ao fluoreno (98% de pureza, Sigma-Aldrich) às concentrações de 0,6 μM (F1) e 1,2 μM (F2). No grupo controle, 0,002% (concentração final) de DMSO foi adicionado. Após os períodos de exposição, quatro ostras de cada tanque (n=12) foram dissecadas, as brânquias foram removidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , para a realização das análises moleculares. Duas ostras de cada tanque (n=6) foram dissecadas, realizados cortes histológicos transversais (abrangendo a região da brânquia, manto, gônada e divertículo digestivo) e os tecidos moles remanescentes foram utilizados para as análises químicas quantitativas destes contaminantes nos tecidos. Ao final do período de aclimação (tempo zero), e após 24h e 96h (controle e grupos expostos), foi realizado um *pool* de duas ostras de cada tanque (n=6) para as análises químicas de pireno e fluoreno.

Nenhuma mortalidade foi observada no grupo controle e expostos durante o experimento. As concentrações de Pireno (PIR) e fluoreno (FLU) foram escolhidas baseadas na possibilidade de risco, ou perigo aos animais e seres humanos, em ambientes aquáticos de acordo com a lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - US EPA). Os tanques com aeração individual foram cobertos com tampas de vidro. Cada grupo de tanques (controle ou expostos) foram mantidos dentro de caixas de madeira hermeticamente fechadas contendo filtros de vapores orgânicos, para evitar potenciais contaminações dos grupos controle e expostos.

2.4.3 Concentração de PIR e FLU na água dos tanques

A concentração de PIR e FLU na água dos tanques, dos grupos controle ou exposto, foi medida por fluorimetria durante as primeiras 24 h de exposição. A depleção de pireno e fluoreno foi monitorada em um tanque para cada HPA contendo as mesmas condições dos grupos expostos, sem ostras. Um mL de água de cada tanque foi amostrado e imediatamente quantificado por leitura fluorimétrica (Pireno: 270 nm excitação / 384 nm emissão; Fluoreno: 258 nm excitação / 313 nm emissão) em espectrofluorímetro (Spectramax M5, Molecular

Devices, Sunnyvale, CA, USA) e transformadas em concentração de cada um dos HPAs a partir de uma diluição seriada de 2 mg. L⁻¹ PIR ou FLU como curva padrão de referência. As amostras foram coletadas a cada 15 min durante a primeira hora de exposição; a cada 30 min durante as 2 h subsequentes; e a cada hora durante as 8 h subsequentes até completar 24 h de monitoramento. O tempo de meia vida dos HPAs, devido ao consumo e à depleção nos tanques com ostras, foi calculado baseado nas respectivas equações de regressão exponencial.

2.4.4 Concentração de PIR e FLU nos tecidos moles de *C. gasar*

As concentrações de PIR e FLU foram quantificadas em 1 g de solução liofilizadas de tecido mole de ostras *C. gasar* (Thermo Savant, modulyoD lyophilizer, Waltham, MA, USA). As amostras foram extraídas com um extrator soxhlet com n-hexano e diclorometano 50% (v/v), de acordo com MacLeod *et al.* (1986), com pequenas modificações. Antes da extração, padrões internos (surrogate), naftaleno-d8, acenafteno-d10, d10-fenantreno, criseno-d12 e perileno-d12 foram adicionados às amostras, ao branco de amostra, e ao material de referência (SRM 2974a – Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue – *Mytilus edulis*). Após a extração, o extrato evaporado foi purificado em coluna cromatográfica de sílica. Para a realização de uma purificação adicional, as amostras foram injetadas em HPLC, com duas colunas de exclusão. As amostras foram concentradas e o padrão interno benzo(b)fluoranteno-d12 foi adicionado. O extrato foi injetado em um cromatógrafo gasoso equipado com um espectrômetro de massa (GC/MS) (6890/5973, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com o modo de aquisição SIM (Selective Ion Monitoring). A identificação dos HPA foi feita a partir da comparação dos tempos de retenção com os padrões de referência, e a quantificação foi calculada por meio da razão entre os padrões internos (*surrogates*) e os compostos de interesse, baseada nas curvas de calibração ajustadas por, ao menos, cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Essa análise foi realizada pelo Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Marcia Caruso Bicego.

2.4.5 Procedimentos histológicos

Cortes da secção transversal dos tecidos de ostras foram realizados (Howard *et al.*, 2004) e fixados em formalina tamponada a 4% (0,1 M, pH 7,3) durante 48 h. Após a fixação

as ostras foram processadas de acordo com um procedimento de rotina de desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina líquida livres de RNases e de DNases (60°C). Cortes de 5µm de espessura foram realizados em micrótomo e montados em lâminas de vidro silanizadas (Sigma-Aldrich, Steinheim). Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. Adicionalmente foi realizada coloração histoquímica com Alcian Blue para detecção da presença de células mucosas no manto, seguindo a metodologia de Cargnin-Ferreira e Sarasquete (2008), com posterior quantificação utilizando-se o software ImageJ (Verion 1.45, Instituto Nacional de Saúde dos EUA, Bethesda, Maryland).

As alterações nas brânquias foram classificadas de acordo com a metodologia proposta por Carballeira et al., (2011) e Ciacci et al., (2012). Alterações dos divertículos digestivos (glândula digestiva) foram avaliadas de forma quantitativa, de acordo com Ellis et al. (1998). A estrutura geral do intestino e estômago foi avaliada segundo Cargnin-Ferreira e Sarasquete (2008) e Sunila (1986). O estágio reprodutivo de cada ostra foi classificado como proposto por Ramos et al., (2013).

2.4.6 Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa

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

2.4.7 Sonda de RNA

O DNA plasmidial foi linearizado com as enzimas BamHI e EcoRV (Promega, Madison) próximo aos promotores do plasmídeo SP6 e T7, seguindo as instruções do fabricante. As sondas de RNA (ribosondas) foram transcritas *in vitro* e marcadas com digoxigenina (DIG) com base no procedimento de Barroso-Chinea et al. (2007). As reações

de transcrição *in vitro* foram realizadas utilizando polimerases de RNA T7 e SP6 apropriadas para sintetizar ribosondas sense e antisense, respectivamente. A mistura de transcrição foi preparada utilizando MAXIscript™ SP6/T7 Transcription Kit (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as ribosondas foram precipitadas adicionando cloreto de lítio 7,5 M, etanol a 100% e Tris 10 mM e EDTA 1 mM, recuperadas por centrifugação a 4°C durante 30 min.

2.4.8 Hibridização *in situ* (ISH)

A reação de hibridização *in situ* foi realizada conforme descrito por dos Reis et al. (2015). A hibridização com as ribosondas sense foi utilizada como controle negativo. Os resultados da presença da isoforma *CYP2AUI* nos diferentes tecidos das ostras expostas por 24 e 96h, a PIR, FLU e controle, foram semi-quantificadas de acordo com o método de avaliação de ISH proposto por Henke et al., (2006), onde o grau da coloração foi classificado como de baixa (+), média (++) e alta (+++) intensidade.

2.4.9 Reação de qPCR

Os níveis de transcritos do gene *CYP2AUI* foram analisados nas brânquias das ostras de cada grupo experimental, por qPCR, em termociclador Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para assegurar a ausência de produtos não específicos e dímeros, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2% e os produtos da amplificação dos iniciadores de *CYP2AUI* (Forward 5'-AACGGCAAGAGGTGTAAGGTTTGC-3' e Reverse 5'-TAATCCATCACCCGGATT GGCAGA-3') foram sequenciados. A eficiência do qPCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores e determinada a partir de uma curva de calibração de cDNA, preparada a partir de uma diluição seriada (400 ng/reação; 200 ng/reação; 100 ng/reação; 50 ng/reação e 25 ng/reação). Para as análises, foram utilizados os genes em que as curvas apresentaram um R² maior ou igual a 0,99 e eficiência entre 98% e 100%. Para testar e escolher os genes de referência foi utilizado o método 2-Cq (Schmittgen e Livak, 2008). Para a normalização dos dados, foram utilizados os genes de referência: Ribossomal 28S-like (28S-like) e β Actina-like (β ACT-like) para o experimento do PIR e os genes Elongation Factor-like (EF-like) e Gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase-like (GAPDH-like) para o FLU. A média geométrica dos valores de Ct desses dois genes foi calculada para cada HPA. Para os genes de interesse, foi aplicado o método 2- Δ Cq

(Schmittgen and Livak, 2008). Todos os dados foram relativizados pelos respectivos grupos controle de cada experimento.

2.4.10 Estatística dos dados

Neste estudo, um desenho estatístico hierárquico foi utilizado para análise molecular e histológica. Normalidade e homoscedasticidade dos dados foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando necessário, os dados foram normalizados usando transformação logarítmica. Para dados normais e homoscedásticos foi aplicado o teste ANOVA de uma via hierárquica (nested) para avaliar o efeito da exposição à HPA em cada tempo de exposição (24 h ou 96 h). Valores de *p* significantes foram ajustados pela correção de Bonferroni. Para a avaliação da atrofia tubular nos divertículos digestivos das ostras expostas à HPA (PIR ou FLU) por 24 e 96 horas, foi aplicado um teste-*t* não paramétrico com permutação pelo procedimento multiteme com correção de Bonferroni (Westfall et al., 1999). Os mesmos testes foram aplicados para análise das células mucosas no manto e o sinal de hibridação nos divertículos digestivos, brânquias e manto. Análise de correlação de Spearman foi realizado entre o sinal de hibridação nos tecidos e o grau de atrofia tubular. Para todas as análises, não foram observados efeitos dos tanques. As diferenças significativas entre os grupos foram definidas como $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism® 8, Statistica 7® e SAS®.

2.5 RESULTADOS

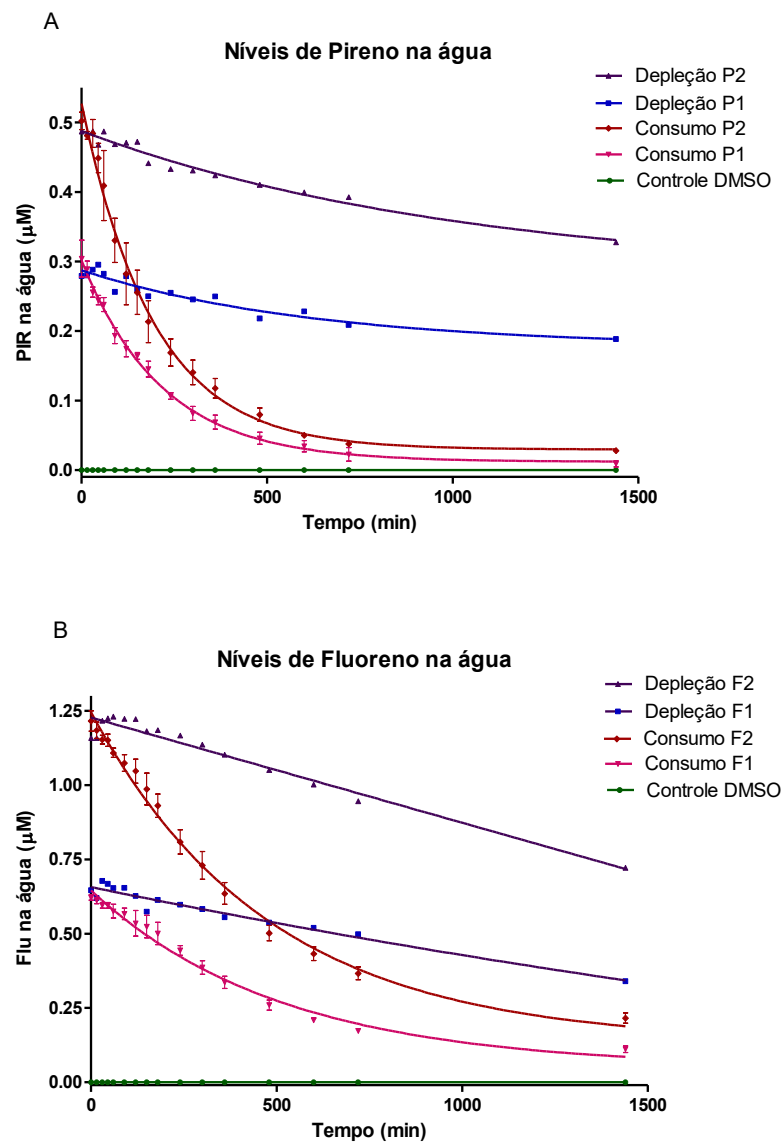
2.5.1 Concentração de PIR e FLU na água dos tanques

Após 24 h de exposição, os níveis de PIR na água contendo ostras diminuíram 97,1% de $0,3 \pm 0,03 \mu\text{M}$ a $0,007 \pm 0,004 \mu\text{M}$ no grupo P1, e diminuiu de maneira semelhante no grupo P2 (94,5%) de $0,5 \pm 0,01 \mu\text{M}$ a $0,03 \pm 0,002 \mu\text{M}$. No tanque sem ostras, os níveis de PIR na água diminuíram de $0,28 \mu\text{M}$ para $0,18 \mu\text{M}$ (32,4%) no grupo P1 e uma diminuição semelhante (32,7%) ocorreu no grupo P2 (de $0,5 \mu\text{M}$ a $0,3 \mu\text{M}$). A meia-vida de PIR no tanque com ostras foi de 2 h e 30 min (P1) e 2 h e 12 min (P2).

No tanque contendo FLU, uma diminuição de 82,1 e 82,3% no grupo F1 e no grupo F2 (de $0,6 \pm 0,009 \mu\text{M}$ a $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e de $1,2 \pm 0,03 \mu\text{M}$ a $0,2 \pm 0,02 \mu\text{M}$, respectivamente) também foram observados (Fig. 3). No tanque sem ostras, os níveis de FLU

diminuíram de 0,64 μM a 0,34 μM (47,4%) no grupo F1 e de 1,16 μM a 0,72 μM (37,7%) no grupo F2. Nos grupos de controle, os níveis de PIR ou FLU estavam abaixo do limite de detecção do método (Fig. 3). A meia-vida do FLU no tanque contendo ostras foi de 5 h e 54 min (F1) e 5 h e 30 min (F2), respectivamente (Fig. 3).

Figura 3: Concentração de pireno (PIR) e fluoreno (FLU) medidos por fluorescência na água dos tanques com (Consumo) ostras ou sem (Depleção) ostras *Crassostrea gasar*, durante 24 h de exposição: (A) Experimento de exposição ao PIR 0,25 μM (P1) e 0,5 μM (P2) e Controle com DMSO, sem ostras; (B) Experimento de exposição ao FLU 0,6 μM (F1) e 1,2 μM (F2) e Controle com DMSO, sem ostras.



Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Zacchi (2017)

2.5.2 Concentração de PIR e FLU nos tecidos de *C. gasar*

Nos grupos controle, os valores de PIR observados nos tecidos de ostra foram 0,006; 0,025 e 0,008, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco nos tempos zero, 24 h e 96 h, respectivamente. Nos grupos expostos após 24 h, os valores foram 37,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (P1) e 54,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (P2). Após 96 h de exposição, os valores foram 72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (P1) e 132,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (P2) (Tabela 1).

Os valores de FLU não foram detectados nos tecidos de *C. gasar* dos grupos controle (T0 e 24 h) e foram 0,006 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco em 96 h. Nos grupos expostos após 24 h, os valores foram 6,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (F1) e 9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (F2). Após 96 h de exposição, os valores foram 12,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (F1) e 24,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (F2) (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração de PIR e FLU ($\mu\text{g}\cdot\text{g}$ peso seco⁻¹) em tecidos moles de *Crassostrea gasar* em 24 e 96 horas de exposição: controle; pireno 0,25 μM (P1) e 0,5 μM (P2); fluoreno 0,6 μM (F1) e 1,2 μM (F2).

| Período | Tratamento | | | | | |
|---------|-------------------------------------|----|-------|-------------------------------------|------|------|
| | PIR $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | | | FLU $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | | |
| | Controle | P1 | P2 | Controle | F1 | F2 |
| 24h | 0,025 | 37 | 54,9 | 0 | 6,9 | 9 |
| 96h | 0,008 | 72 | 132,2 | 0,006 | 12,4 | 24,2 |

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

2.5.3 Histologia

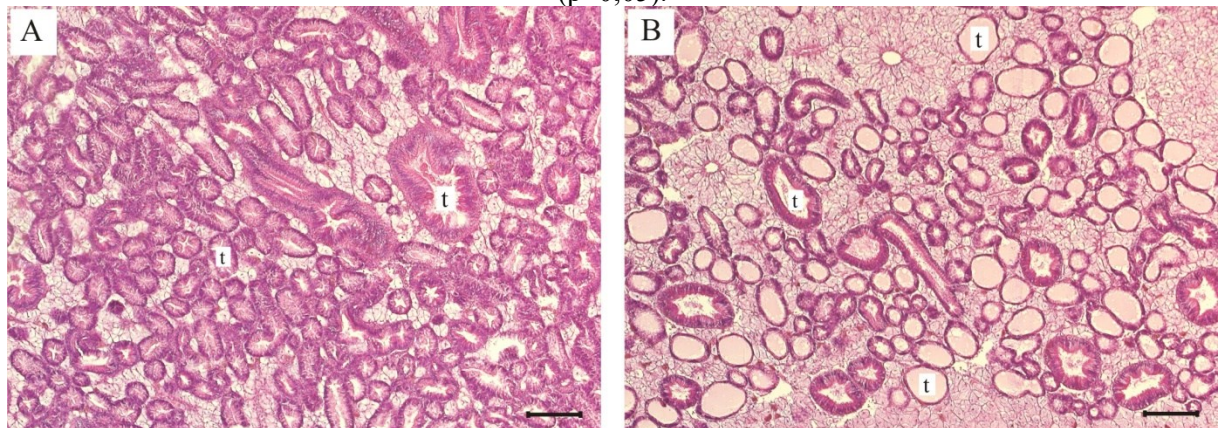
A análise por microscopia de luz revelou alterações na estrutura do tecido dos divertículos digestivos e no manto de ostras expostas a PIR e FLU e respectivos grupos controle. Após 24 h de exposição a PIR, divertículos digestivos de *C. gasar* apresentaram um aumento significativo no nível de atrofia tubular em P2 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 4). O mesmo não ocorreu após 96 h, onde não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Interações significativas foram observadas entre as concentrações e os períodos de exposição nas ostras expostas a PIR ($p < 0,05$), sugerindo um efeito combinado destes parâmetros na exposição ao PIR sobre a atrofia tubular nas ostras *C. gasar*. Nos divertículos digestivos das ostras expostas a FLU, não foram observadas diferenças significativas na atrofia tubular em F1 ou F2 em comparação ao grupo controle, após 96 h e 24 h de exposição ($p > 0,05$). No entanto, ao longo do tempo de exposição ocorreu

um aumento da atrofia tubular das ostras expostas a FLU ($p < 0,05$) (Fig. 4D). Hipertrofia, hiperplasia, células marrons ou parasitas não foram observadas nos divertículos digestivos das ostras.

No manto das ostras expostas a PIR 0,25 μM (P1) foram observadas diferenças significativas na porcentagem de células mucosas após 96 h ($p < 0,05$). Além disso, foi observada uma interação significativa entre o período de exposição e a porcentagem de células mucosas de ostras expostas a PIR ($p < 0,05$) (Fig. 5E). Não foram detectadas diferenças significativas no percentual de células mucosas de ostras expostas a FLU.

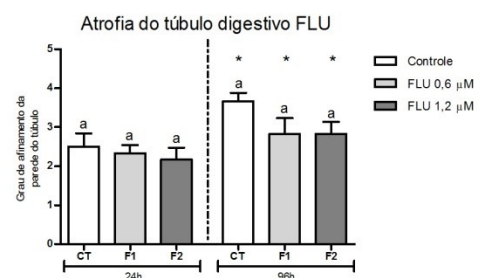
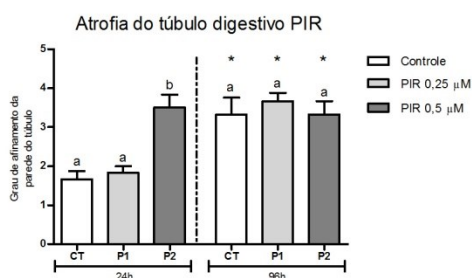
O sexo das ostras não foi identificado previamente nesse experimento. Por meio de exame histológico das gônadas não foi possível determinar o sexo dos animais devido ao estágio reprodutivo de pós-desova (repouso/indeterminado) de ostras expostas a PIR e FLU e grupos controle (Fig. 6).

Figura 4: Atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gasar* expostas aos HPAs (PIR e FLU) por 24 e 96h e grupos controle. (A) Túbulos digestivos (t) com baixo grau de atrofia (Grupo controle PIR 24h); (B) Túbulos digestivos com forte grau de atrofia (Ostras expostas a PIR 0,5 μM por 24h). Barras: 100 μm ; Coloração HHE; Análise semi-quantitativa da atrofia tubular no divertículo digestivo de ostras *C. gasar* expostas a duas concentrações de PIR(C) e FLU (D) por 24 e 96h e grupos controle. O grau de atrofia foi classificado de acordo com dos Reis et al. (2015) e Ellis et al. (1998) como 0–1 (túbulo normal), 1–2 (presença baixa), 2–3 (presença moderada), 3–4 (presença forte). Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Asteriscos representam diferenças entre os tempos ($p < 0,05$).



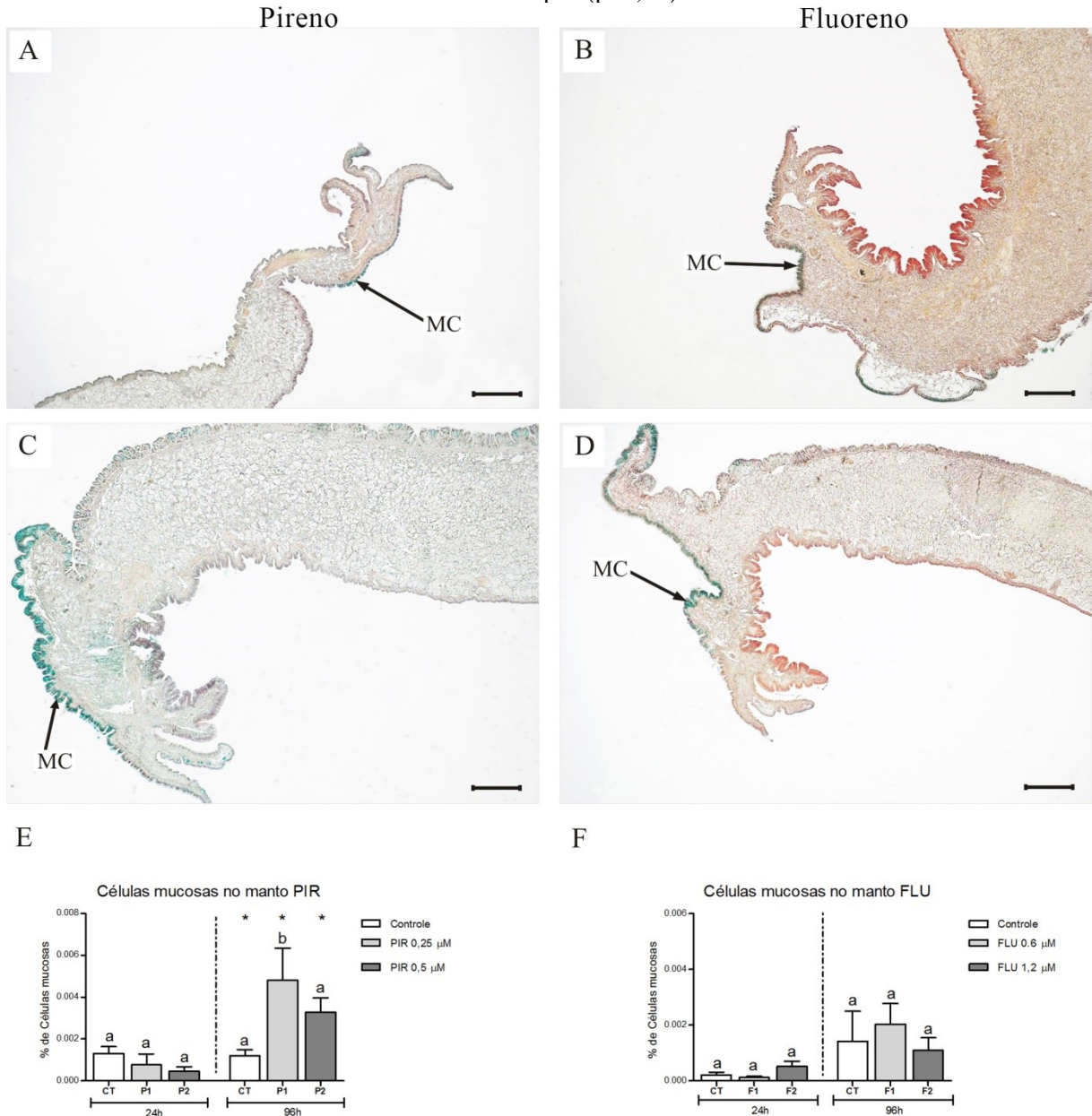
C

D



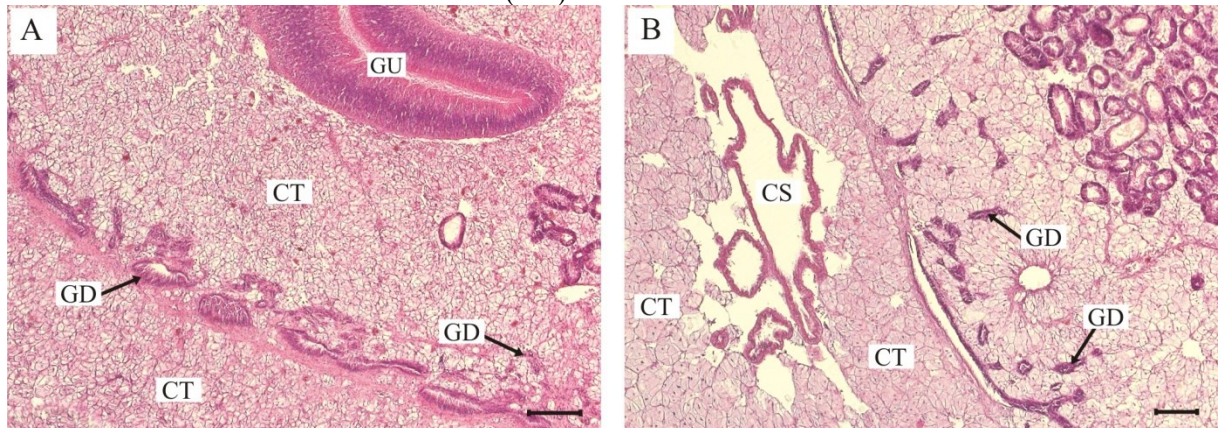
Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Figura 5: Percentual de células mucosas no manto de ostras *C. gasar* expostas a PIR e FLU por 24 e 96h e grupos controle. (A) Presença de células mucosas (MC) na borda do manto de ostras (Grupo controle PIR 24h); (B) na borda do manto de ostras (Grupo controle FLU 96h); (C) na borda do manto de ostras expostas a PIR 0,25 μM por 24h e (D) na borda do manto de ostras expostas a FLU 0,6 μM por 96h. Barras: 100 μm ; Coloração Alcian Blue; Percentual de células mucosas no manto de ostras *C. gasar* expostas a duas concentrações de PIR (E) e FLU (F) por 24 e 96h e grupos controle. Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Asteriscos representam diferenças entre os tempos ($p < 0,05$).

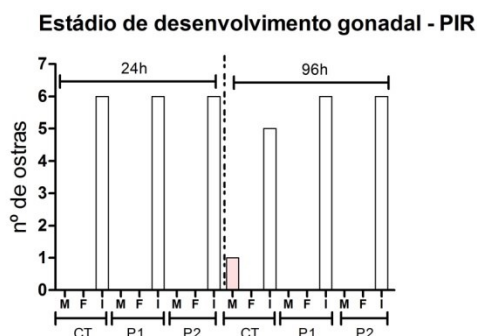


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

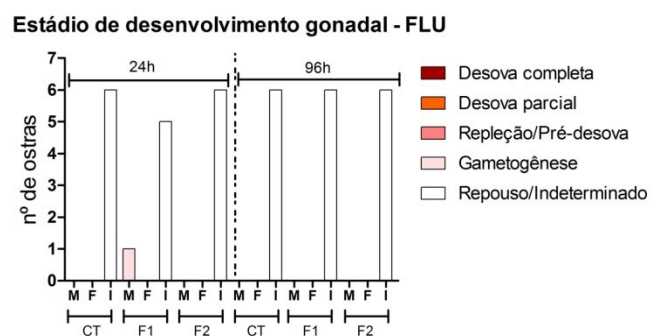
Figura 6: Estádios de desenvolvimento gonadal de ostras *C. gasar* expostas a PIR e FLU por 24 e 96h e grupos controle. (A) Estádio de repouso/indeterminado das gônadas (Grupo controle PIR 24h); (B) Estádio de repouso/indeterminado nas gônadas (Grupo controle FLU 96h); Gráfico dos diferentes estádios de desenvolvimento gonadal (repouso/indeterminado, gametogênese, pré-desova, desova parcial, desova completa) de ostras macho (M), fêmea (F) e indeterminado (I) expostas a (C) PIR e (D) FLU por 24 e 96h e grupos controle. Barras: 100 μ m (A) 200 μ m (B); Coloração HHE; (CT) tecido conjuntivo; (GD) gônada em desenvolvimento (CS) desova completa (GU) intestino.



C



D



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

2.5.4 Localização dos mRNAs do *CYP2AU1*

O sinal dos transcritos do *CYP2AU1* utilizando a técnica de ISH foi detectado nas células epiteliais branquiais, nas esferas excretoras do túbulo digestivo e na borda do manto de ostras *C. gasar*. Lâminas contendo a sonda sense (controle negativo) não mostraram um sinal positivo para *CYP2AU1* (Fig. Suplementar 1), no entanto, as lâminas contendo a sonda de mRNA complementar (antissense) revelaram a cor azul/roxa em órgãos-alvo (Fig. 7).

Diferenças significativas na intensidade do sinal foram observadas nas ostras expostas a PIR em tecidos específicos, quando comparados aos seus respectivos controles ($p < 0,05$) (Tabela 2). Após 24 horas de exposição a PIR, diferenças significativas foram observadas no sinal do *CYP2AU1* em brânquias de ostras ($p < 0,05$). Além disso, o sinal *CYP2AU1* nas brânquias foi positivamente correlacionado no manto e divertículos digestivos

($p < 0,05$) (Tabela Suplementar 1). Com o aumento do período de exposição (96 h), o sinal de hibridização foi observado nos divertículos digestivos e nas brânquias expostas a P1 e nas brânquias e manto de ostras expostas a P2.

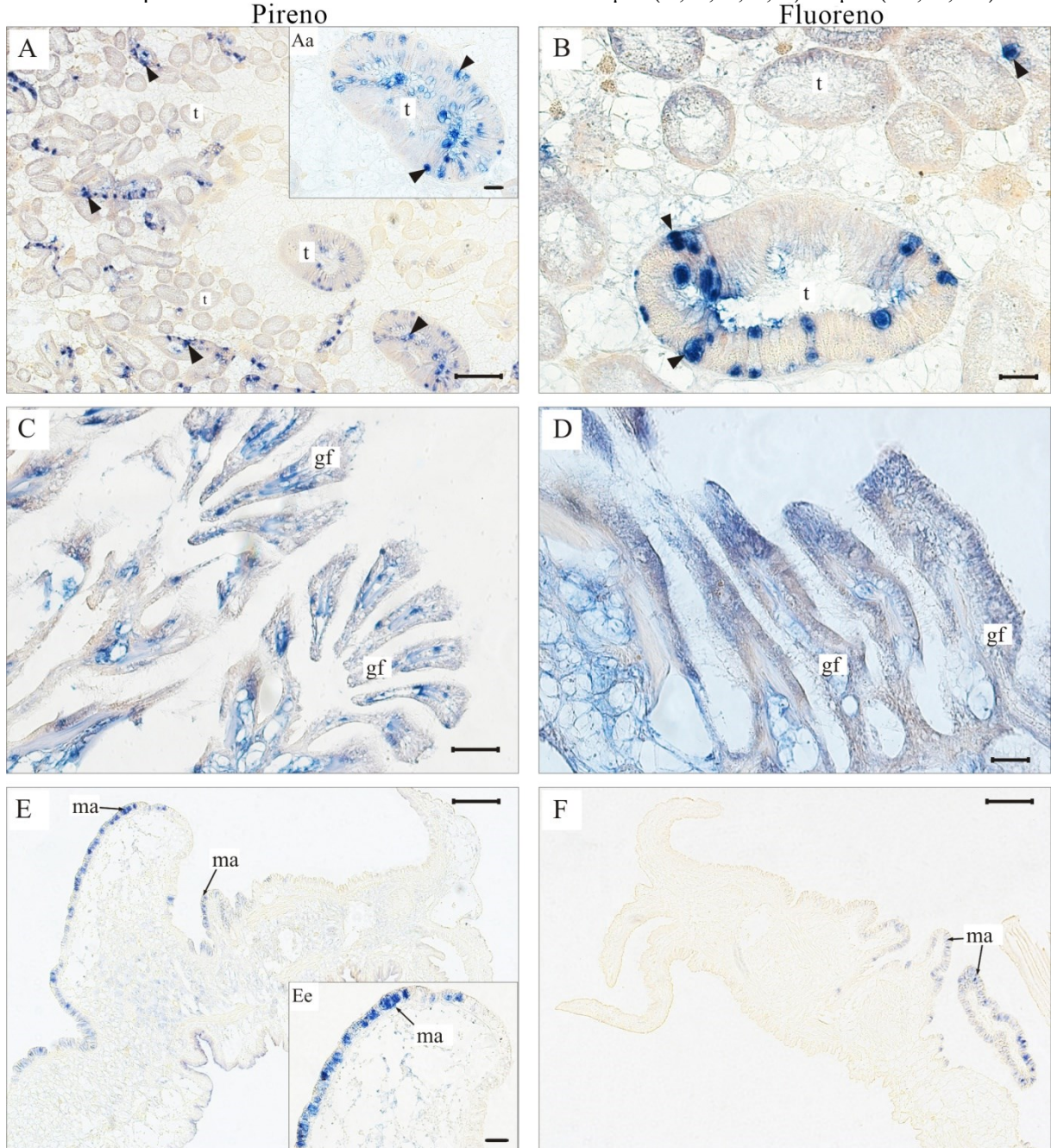
Independentemente do tempo de exposição (24 h ou 96 h), as ostras mostraram maior intensidade de sinal na brânquia e no manto quando expostas à maior concentração de FLU (F2). Correlações fortes e positivas ($\rho = 0,78$) foram observadas entre esses órgãos (Tabela Suplementar 2). Nas brânquias, a intensidade do sinal só foi significativa após 96 h de exposição no grupo F2 (Tabela 3) ($p < 0,05$), corroborando com os resultados dos níveis de transcritos para este mesmo gene (Fig. 7b).

Tabela 2: Avaliação semi-quantitativa de ISH (sonda antissense) de sinal positivo (azul/roxo), segundo Henke et al., (2006) em ostras *Crassostrea gasar* expostas a duas concentrações de PIR e FLU por 24 e 96h e respectivos grupos controle. *Diferenças significativas em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ (ANOVA). Grau de intensidade de sinal utilizada: (-) sem reação, (+) baixo sinal, (++) moderado, (+++) forte sinal.

| HPA | Tempo | Grupo (μM) | Tecido/Órgão | | | |
|--------|----------|-------------------------|-----------------------|----------|-------|------|
| | | | Divertículo digestivo | Brânquia | Manto | |
| Pireno | 24 h | Controle | + | + | ++ | |
| | | 0.25 | + | + | + | |
| | | 0.5 | ++ | +++* | +++ | |
| | 96 h | Controle | + | + | + | |
| | | 0.25 | +++* | +++* | ++ | |
| | | 0.5 | ++ | +++* | +++* | |
| | Fluoreno | 24 h | Controle | + | + | + |
| | | | 0.6 | ++ | + | + |
| | | | 1.2 | ++ | +++* | +++* |
| 96 h | | Controle | + | - | + | |
| | | 0.6 | + | ++ | ++ | |
| | | 1.2 | ++ | +++* | +++* | |

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Figura 7: Localização de transcritos de mRNA de *CYP2AUI* por ISH em divertículo digestivo, brânquias e manto de ostras *C. gasar* expostas a duas concentrações de PIR e FLU por 24 e 96h e respectivos grupos controle. (A) Sinal positivo nos divertículos digestivos (azul / roxo) detectado nas células excretoras (ponta de seta) dos túbulos digestivos (t) de ostras expostas a P1 por 96 h e expostas a F2 por 96 h (B). (Aa) Alta ampliação dos túbulos digestivos, detalhe de células excretoras expelidas para o lúmen. Sinal positivo em azul / roxo nos filamentos branquiais (gf) (C, D) e na borda do manto (ma) (E, F) das ostras expostas ao P2 por 96 h. (Ee) Alta ampliação da borda do manto e detalhe das células epiteliais do manto em azul / roxo. Barras: 100 μ m (A, B, C, E, F) 20 μ m (Aa, D, Ee).



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

2.6 DISCUSSÃO

É frequente a utilização de moluscos bivalves em programas de biomonitoramento ambiental. Bivalves são filtradores e, acumulam contaminantes químicos que podem atingir concentrações teciduais de substâncias químicas de origem antropogênica milhares de vezes superiores aos da coluna de água (Oliver and Fisher, 1999). Diante disso, em estudos realizados em laboratório, Moore e colaboradores (1984) e dos Reis e colaboradores (2015) observaram que mexilhões *M. edulis* e ostras *C. gasar* bioconcentraram altas taxas de fenantreno nos tecidos, quando expostos por até 3 e 10 dias, respectivamente.

No presente estudo foi observado que tanto PIR quanto FLU bioconcentraram nos tecidos das ostras (Tabela 1) durante o período de exposição, concomitantemente com um decréscimo nos níveis desses HPAs na água (Fig. 3). Uma meia-vida mais alta foi observada nas ostras expostas a 0,6 µM de FLU em comparação com PIR, quando expostas às mesmas concentrações (Fig. 3) e pode estar relacionado à biodisponibilidade desses HPAs em soluções aquosas. PIR tem maior coeficiente de partição octanol-água do que FLU (Bruggeman et al., 1982; Miller et al., 1985; Sangster, 1989), o que reflete em sua maior capacidade de bioconcentração (Sikkema et al., 1994, 1995), possibilitando um risco maior de respostas moleculares e histológicas nas ostras expostas a este HPA.

Outro fator determinante na quantidade de contaminante bioconcentrado nos tecidos são as diferentes características de cada órgão. As gônadas são órgãos que possuem grande quantidade de conteúdo lipídico e, portanto acumulam maior quantidade de HPA (Lee et al., 1996; Negro et al., 2012). Nossos resultados mostraram que as ostras se encontraram em período reprodutivo de pós-desova (repouso/indeterminado). Nesse estágio, as gônadas ficam vazias e a quantidade de células reprodutivas é praticamente nula (Ramos et al., 2013), diminuindo a quantidade de conteúdo lipídico e, conseqüentemente, do contaminante nesses órgãos. Essa pode ser uma das razões pelas quais as concentrações dos HPA terem sido mais baixas nos tecidos do que em estudos anteriores (dos Reis et al., 2015; Lima et al., 2018; Zacchi et al., 2017), principalmente do FLU que é menos lipossolúvel. Respostas semelhantes também foram relatadas em amostragens de campo (Piccardo et al., 2001; Ruiz et al., 2011; Viñas et al., 2012) e em laboratório (Xiu et al., 2016, 2015), onde bivalves em condições pós-desova mostraram uma redução significativa nos níveis de contaminantes.

Em relação ao divertículo digestivo, foi observado que os túbulos digestivos de ostras *C. gasar* sofreram alterações morfológicas associadas ao estado de alimentação e contaminação por PIR. Acredita-se que além do efeito do PIR, a oferta de alimentação

artificial nos períodos de aclimação e experimental pode ter influenciado no estabelecimento da atrofia dos túbulos digestivos das ostras. A atrofia do túbulo digestivo é uma condição caracterizada pela redução na espessura do epitélio tubular acompanhada pela ampliação do lúmen nos túbulos digestivos em bivalves marinhos (Matozzo et al., 2018; Do-Hyung Kang et al., 2010). Essa condição pode ser induzida por estresse ambiental, alimentos com baixo teor nutricional e contaminação da água (Couch, 1984; Syasina et al., 1997; Weinstein, 1997). A atrofia tubular já foi observada em bivalves expostos a outros HPA (Al-Subiai et al., 2012; Bignell et al., 2011; Cuevas et al., 2015; dos Reis et al., 2015).

Existe uma carência de estudos que relacionem a atrofia tubular com a necessidade nutricional dos bivalves e também do desenvolvimento de dietas artificiais (Knauer and Southgate, 1999). Nesse estudo, as ostras foram alimentadas com níveis adequados de biomassa artificial de algas (Knauer and Southgate, 1999), entretanto, acredita-se que a digestibilidade e os micronutrientes essenciais da ração comercial utilizada podem ter sido insuficientes para suprir o balanço energético desses animais, ocasionando a atrofia dos túbulos digestivos das ostras, tanto do grupo controle, quanto expostos. Isso foi evidenciado pelo aumento da atrofia dos túbulos digestivos das ostras observado durante o período experimental (Fig. 4). Além deste efeito nutricional, a combinação (ou seja, a interação) do período e a exposição ao PIR também afetaram significativamente a atrofia dos túbulos digestivos ($p < 0,05$), como observado na Fig. 4C. Para validar essa hipótese, através do uso da técnica de ISH, foi observada uma correlação positiva entre o sinal do *CYP2AUI* e a atrofia tubular no divertículo digestivo após exposição a PIR ($\rho = 0,46$, Tabela suplementar 1). Essa relação já foi observada em estudos anteriores com ostras expostas a fenantreno (dos Reis et al., 2015), sugerindo que a perda de células digestivas com respectiva redução do epitélio digestivo pode estar associada com a biotransformação de HPA catalisada pelo CYP.

Nas brânquias, apesar da ausência de alterações na estrutura morfológica geral, foi observado um sinal significativamente mais elevado de *CYP2AUI* nas ostras expostas a PIR (Tabela 2), indicando que o sinal de *CYP2AUI* nas células branquiais é mais sensível à exposição a PIR. Para validar os dados de ISH, a análise de PCR em tempo real (Fig. Suplementar 2) mostrou que os níveis de transcritos de *CYP2AUI* na brânquia de ostras expostas a P2 quando comparadas aos controles foram mais altos em 24h e 96h (3,8 vezes e 1,8 vezes, respectivamente). Com relação às ostras expostas a FLU, o sinal significativo de hibridização do *CYP2AUI* foi observado apenas em ostras expostas a F200 após 96h. Curiosamente, esses resultados corroboram com os dados de PCR em tempo real observados

apenas em ostras expostas a FLU após 96h. Os níveis de transcritos foram aumentados 2,3 vezes em F200 quando comparadas ao grupo controle (Fig. Suplementar 2).

Embora pouco se saiba sobre a função biológica de *CYP2AUI*, o nível de transcritos desse mesmo gene em *C. gasar* foi afetado após exposição ao fenantreno em brânquias, divertículo digestivo, intestino e manto (dos Reis et al., 2015; Lima et al., 2018; Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2017). No manto, o sinal *CYP2AUI* foi detectado pela técnica de ISH nas células epiteliais do lobo interno, médio e externo em ostras expostas a 100 µg.L⁻¹ fenantreno (dos Reis et al., 2015), corroborando o presente estudo. Somadas a esses estudos com fenantreno, as respostas do gene *CYP2AUI* em ostras expostas a ambas concentrações de PIR (0,25 e 0,5 µM) e FLU (0,6 e 1,2 µM) sugerem uma importante participação desse gene no metabolismo de HPA de *C. gasar*.

Além dessas respostas no divertículo digestivo e brânquias, alterações histopatológicas no manto como a presença de secreções mucosas também desempenham um papel importante na resposta do animal a mudanças na composição química do ambiente circundante (Sze e Lee, 1995). Neste estudo, o maior percentual de células mucosas (mucócitos) no manto foi observado em ostras expostas a PIR (Fig. 5E). O aumento de mucócitos é considerado um mecanismo de defesa em bivalves contra a exposição a contaminantes (David et al., 2008; Fasulo et al., 2008; Valdez Domingos et al., 2007). Nos bivalves o muco desempenha um importante papel em diversas funções biológicas. No processo de alimentação, o muco auxilia na captura e transporte de partículas, na produção de pseudofezes e também previne a perda de água quando esses animais são expostos ao ar (Sze e Lee, 1995). Além disso, a secreção mucosa auxilia na locomoção, navegação e defesa contra predadores, e tem como principal função a proteção dos órgãos contra os efeitos físicos, químicos e danos biológicos (Schmidt-Nielsen et al., 1971; Hargens e Shabica, 1973). Sendo assim, distúrbios na presença de muco no manto ocasionados pelo contato direto com HPA na água podem causar danos irreversíveis para a saúde desses animais.

2.7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se sugerir que PIR e FLU sejam biotransformados por sistemas enzimáticos associados ao citocromo P450 e, ainda assim, ocorra sua bioconcentração desses HPAs nos tecidos das ostras *C. gasar*. O estágio reprodutivo de pós-desova (repouso/indeterminado) possivelmente influenciou a bioconcentração desses contaminantes. Ostras bioconcentraram maior quantidade de PIR por

ser mais lipossolúvel, o que possivelmente está relacionado a uma maior resposta histológica, de localização e de expressão de mRNA de *CYP2AUI* em diferentes tecidos. A alimentação com ração artificial pode ter sido insuficiente para suprir o balanço energético desses animais, ocasionando a atrofia tubular. O aumento dos níveis de transcritos de *CYP2AUI* em ostras expostas a PIR e FLU sugere o uso desse gene como potencial biomarcador de exposição a esses HPA em *C. gasar*. Níveis elevados de PIR foram observados em tecidos de *C. gasar* associados ao aumento de mucócitos no manto como mecanismo de defesa, aparecimento de atrofia tubular nos divertículos digestivos e o sinal de *CYP2AUI* em brânquias, manto e divertículos digestivos. O papel biológico do *CYP2AUI* no metabolismo desta espécie permanece para ser identificado, todavia, os dados do presente estudo corroboram dados anteriores que mostram que a transcrição desse gene é induzida por contaminantes e, nesse caso, por PIR e FLU.

2.8 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Coeficiente de correlação de Spearman's entre o sinal de transcritos do *CYP2AUI* no divertículo digestivo, brânquia, manto e o grau de atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gasar* expostas a PIR. Valores em negrito mostram a correlação significativa ($p < 0.05$) entre as variáveis.

| | Divertículo digestivo | Atrofia tubular | Brânquia | Manto |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|-----------------|--------------|
| Divertículo digestivo | | 0,46 | 0,64 | 0,29 |
| Atrofia tubular | 0,46 | | 0,48 | 0,09 |
| Brânquias | 0,64 | 0,48 | | 0,58 |
| Manto | 0,29 | 0,09 | 0,58 | |

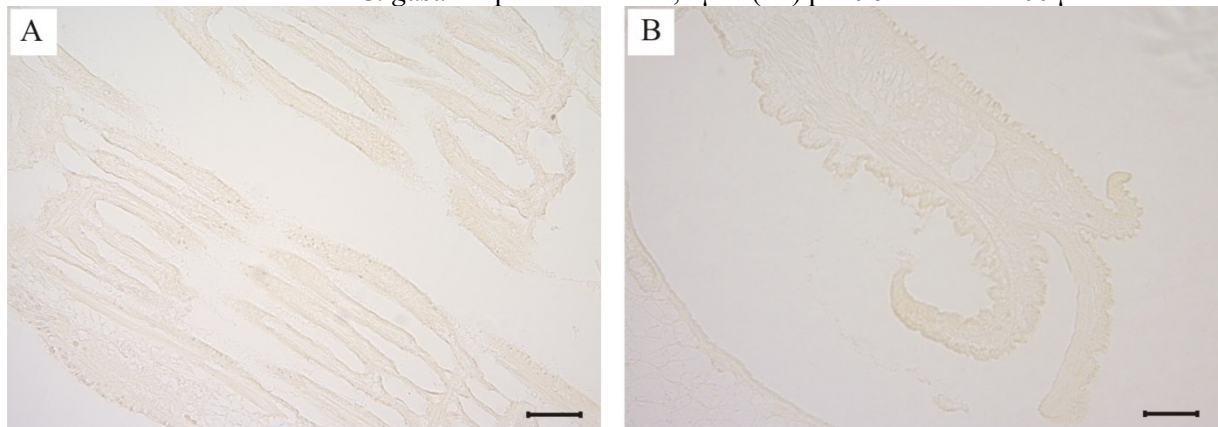
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Tabela Suplementar 2. Coeficiente de correlação de Spermán's entre o sinal de transcritos do *CYP2AUI* no divertículo digestivo, brânquia, manto e o grau de atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gasar* expostas a FLU. Valores em negrito mostram a correlação significativa ($p < 0.05$) entre as variáveis.

| | Divertículo digestivo | Atrofia tubular | Brânquia | Manto |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|-----------------|--------------|
| Divertículo digestivo | | -0,22 | 0,20 | 0,19 |
| Atrofia tubular | -0,22 | | -0,25 | -0,18 |
| Brânquias | 0,20 | -0,25 | | 0,78 |
| Manto | 0,19 | -0,18 | 0,78 | |

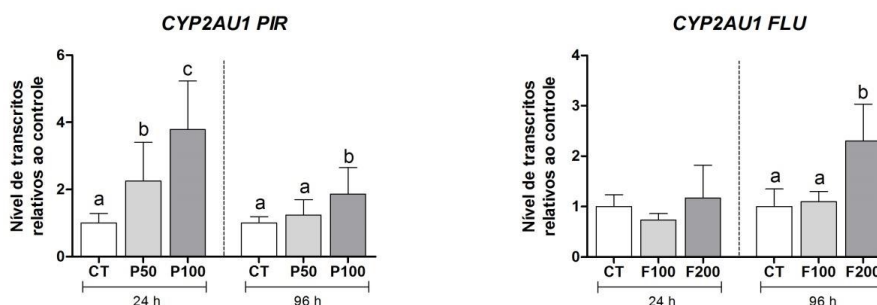
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Figura Suplementar 1: Sonda sense (controle negativo da técnica) hibridizada com o mRNA sem o sinal de detecção (azul/roxo) nas brânquias (A) da ostra *C. gasar* expostas a PIR 0,5 μM (P1) por 96h e no manto da ostra *C. gasar* expostas a FLU 1,2 μM (F2) por 96h. Barras: 100 μm .



Fonte: Elaborada pela autora (2019)

Figura Suplementar 2: Nível de transcritos do gene *CYP2A1* em brânquias de ostras *C. gasar* expostas a PIR (A), 0,25 μ M (P1) e 0,5 μ M (P2) e grupo controle e expostas a FLU (B) 0,6 μ M (F1) e 1,2 μ M (F2) e grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão.



Fonte: Zacchi F.L, 2017.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011
- Aguirre-Rubí, J., Luna-Acosta, a., Ortiz-Zarragoitia, M., Zaldibar, B., Izagirre, U., Ahrens, M.J., Villamil, L., Marigómez, I., 2018. Assessment of ecosystem health disturbance in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as sentinel species. *Sci. Total Environ.* 618, 718–735. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.098
- Alegbeleye, O.O., Opeolu, B.O., Jackson, V., 2017. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. *Brazilian J. Microbiol.* 48, 314–325. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.027
- Al-Subiai, S.N., Arlt, V.M., Frickers, P.E., Readman, J.W., Stolpe, B., Lead, J.R., Moody, a. J., Jha, A.N., 2012. Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: An integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C 60 fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus sp.* *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 745, 92–103. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.019
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817–834. doi:10.1016/j.marpollbul.2004.02.032
- Barroso-Chinea, P., Aymerich, M.S., Castle, M.M., Pérez-Manso, M., Tuñón, T., Erro, E., Lanciego, J.L., 2007. Detection of two different mRNAs in a single section by dual in situ hybridization: a comparison between colorimetric and fluorescent detection. *J. Neurosci. Methods* 162, 119–28. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.12.017
- Beach, D.G., Hellou, J., 2011. Bioaccumulation and biotransformation of 1-hydroxypyrene by the marine whelk *Neptunea Lyrata*. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91, 1227–1243. doi:10.1080/03067310903524830

- Bignell, J.P., Stentiford, G.D., Taylor, N.G.H., Lyons, B.P., 2011. Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. *Mar. Environ. Res.* 72, 25–32. doi:10.1016/j.marenvres.2011.05.004
- Bruggeman, W.A., Van Der Steen, J., Hutzinger, O., 1982. Reversed-phase thin-layer chromatography of polynuclear aromatic hydrocarbons and chlorinated biphenyls relationship with hydrophobicity as measured by aqueous solubility and octanol-water partition coefficient. *J. Chromatogr.* 238,335-346. A. doi:10.1016/S0021-9673(00)81319-9
- Cajaraville, M.P., Orive, E., Villate, F., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Garmendia, L., Ortiz-Zarragoitia, M., Seoane, S., Iriarte, A., Marigómez, I., 2016. Health status of the Bilbao estuary: A review of data from a multidisciplinary approach. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 179, 124–134. doi:10.1016/j.ecss.2016.01.013
- Carballeira, C., Espinosa, J., Carballeira, a., 2011. Linking $\delta^{15}\text{N}$ and histopathological effects in molluscs exposed in situ to effluents from land-based marine fish farms. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2633–2641. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.034
- Cargnin-Ferreira, E., Sarasquete, C., 2008. *Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 120-121, 109–118. doi:10.1016/j.aquatox.2012.04.015
- Couch, J. a, 1984. Atrophy of Diverticular Epithelium as an Indicator of Environmental Irritants in the Oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 14, 525–526.
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P.M., Franco, J., Larreta, J., 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquat. Toxicol.* 162, 152–164. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.011
- David, J.A.D.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. *Micron* 39, 1293–1299. doi:10.1016/j.micron.2008.03.001
- Ramos, C.O., Ferreira, J.F., Melo, C.M.R., 2013. Maturation of native oyster *Crassostrea gasar* at different diets in the laboratory. *Bol. Inst. Pesca* 39, 107–120.
- Do-Hyung Kang, Fu-Lin E. Chu, Hyun-Sung Yang, Chang-Ho Lee, Hyeong-Beom Koh na Kwang-Sik Choi. 2010. Growth, Reproductive Condition, and Digestive Tubule Atrophy of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the Southern Coast of Korea. *Journal of Shellfish Research*, 29(4):839-845. doi: 10.2983/035.029.0418
- Dos Reis, I.M.M., Mattos, J.J., Garcez, R.C., Zacchi, F.L., Miguelão, T., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Cargnin-Ferreira, E., Bainy, A.C.D., 2015. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2A1) in *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 169, 79–89. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.011

Ellis, M.S., Barber, R.D., Hillman, R.E., Kim, Y., Powell, E.N., Port Norris, N.J., 1998. Histopathology analysis. Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993–1996 Update, pp. 198.

EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. EFSA J. 724, 1–114

Fasulo, S., Mauceri, a, Giannetto, a, Maisano, M., Bianchi, N., Parrino, V., 2008. Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. Aquat. Toxicol. 88, 62–8.
doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.009

Fowler, J., Cohen, L., 1998. Practical Statistics for Field Biology. John Wiley & Sons, New York.

Frena, M., Bataglion, G. a., Sandini, S.S., Kuroshima, K.N., Eberlin, M.N., Madureira, L. A. S., 2017. Distribution and sources of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of itajaí-Açu estuarine system in Brazil. J. Braz. Chem. Soc. 28, 603–614.
doi:10.21577/0103-5053.20160205

Galtsoff, P.S., 1964. The American Oyster, *Crassostrea Virginica* Gmelin. U.S. Fish Wildl. Serv., Fish. Bull., 64: 480 pp.

Hargens, A.R., Shabica, S.V., 1973. Protection against lethal freezing temperatures by mucus in an Antarctic limpet. Cryobiology 10, 331–337.

Henke, R.T., Eun Kim, S., Maitra, A., Paik, S., Wellstein, A., 2006. Expression analysis of mRNA in formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues by mRNA in situ hybridization. Methods 38, 253–262. doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.013

Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans, 5. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, pp. 218.

Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H., 2014. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. Methods Mol. Biol. 1116, 271–302. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_18

Knauer, J., Southgate, P.C., 1999. A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. Rev. Fish. Sci. 7, 241–280. doi:10.1080/10641269908951362

Lee, K.M., Kruse, H., Wassermann, O., 1996. Seasonal fluctuation of organochlorines in *Mytilus edulis* L. from the south west Baltic Sea. Chemosphere 32, 1883–1895.

Lima, D., Zacchi, F.L., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Gomes, C.H.A.D.M., de Mello, Á.C.P., Siebert, M.N., Piazza, C.E., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bicego, M.C., Bebianno, M.J., de Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., 2018. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. Chemosphere 209, 307–318.
doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.094

- Lüchmann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan, R., Craft, J. A., Meng, X., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C., Bainy, A.C.D., 2014. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 152, 324–334. doi:10.1016/j.aquatox.2014.04.021
- MacLeod, W.D., Brown, D.W., Friedman, A.J., Burrows, D.G., Maynes, O., Pearce, R.W., Wigren, C.A., Bogar, R.G., 1986. *Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985–1986. Extractable Toxic Organic Components*, second ed. U.S. Department of Commerce, pp. 121, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92.
- Maioli, O.L.G., Rodrigues, K.C., Knoppers, B. a., Azevedo, D. a., 2010. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 1543–1551. doi:10.1590/S0103-50532010000800020
- Matozzo, V., Ercolini, C., Serracca, L., Battistini, R., Rossini, I., Granato, G., Quagliari, E., Perolo, A., Finos, L., Arcangeli, G., Bertotto, D., Radaelli, G., Chollet, B., Arzul, I., Quaglio, F., 2018. Assessing the health status of farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through histological, microbiological and biomarker analyses, *Journal of Invertebrate Pathology*. doi:10.1016/j.jip.2018.02.018
- Miller, M.M., Wasik, S.P., Huang, G.L., Shiu, W.Y., Mackay, D., 1985. Relationships between octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Environ. Sci. Technol.* 19,522-529. doi:10.1021/es00136a007
- Moore, M.N., Livingstone, D.R., Widdows, J., Lowe, D.M., Pipe, R.K., Jones, R.E., 1987. Molecular, Cellular and Physiological Effects of Oil-Derived Hydrocarbons on Molluscs and Their Use in Impact Assessment [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 316, 603–623. doi:10.1098/rstb.1987.0041
- Moore, M.N., Widdows, J., Cleary, J.J., 1984. Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: Interactive effects. *Mar. Environ. Res.* 14, 167–183. doi:10.1016/0141-1136(84)90077-1
- Moura, B.M.D. De, Lima, E.B.N.R., 2018. Estudo Sistemático Sobre Poluição Por Cargas Difusas Em Bacias Urbanas. *E&S Eng. Sci.* 7, 18. doi:10.18607/ES201876512
- Muangchinda, C., Yamazoe, A., Polrit, D., Thoetkiattikul, H., Mhuantong, W., Champreda, V., Pinyakong, O., 2017. Biodegradation of high concentrations of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous bacteria from a river sediment: a microcosm study and bacterial community analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 4591–4602. doi:10.1007/s11356-016-8185-9
- Negro, C.L., Senkman, L.E., Vierling, J., Repetti, M.R., García, S.R., Collins, P., 2012. Bioaccumulation in freshwater crabs. Endosulfan accumulation in different tissues of *Zilchiopsis collastinensis* P. (Decapoda: Trichodactylidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89 (5), 1000–1003.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers* 4, 510–530. doi:10.1080/135475099230679

- Piccardo, M.T., Coradeghini, R., Valerio, F., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in native and caged mussels. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (10), 951–956.
- Puy-Azurmendi, E., Navarro, A., Olivares, A., Fernandes, D., Martínez, E., López de Alda, M., Porte, C., Cajaraville, M.P., Barceló, D., Piña, B., 2010. Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in sediment and fish from the biosphere reserve of Urdaibai (Bay of Biscay, Basque country, Spain). *Mar. Environ. Res.* 70, 142–149. doi:10.1016/j.marenvres.2010.04.004
- Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman, R., 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40, 557–563. doi:10.1016/S0045-6535(99)00320-3
- Ruiz, Y., Suarez, P., Alonso, A., Longo, E., Villaverde, A., San Juan, F., 2011. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environ. Pollut.* 159 (1), 250–265.
- Sangster, J., 1989. Octanol-water partition coefficients for simple organic compounds. *J. Phys. Chem.* 18, 1111–1229. doi:10.1063/1.555833
- Schmidt-Nielsen, K., Taylor, C. R., Shkolnik, A., 1971. Desert Snails : Problems of Heat, Water and Food. *J. Exp. Biol.* 385–398.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Sindermann, C.J., 1980. Pollution effects on fisheries - potential management activities. *Helgol. Meeresuntersuchungen* 33, 674–686. doi:10.1007/BF02414788
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022–8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- Speciale, a., Zena, R., Calabrò, C., Bertuccio, C., Aragona, M., Saija, a., Trombetta, D., Cimino, F., Lo Cascio, P., 2018. Experimental exposure of blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) to high levels of benzo[a]pyrene and possible implications for human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 96–103. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.038
- Sunila, I., 1986. Histopathological changes in the mussel (*Mytilus edulis*) at the outlet from a titanium dioxide plant in Northern Baltic. *Ann. Zool. Fennici* 23, 61–70.
- Syasina, I.G., Vaschenko, M. a., Zhadan, P.M., 1997. Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia: Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Mar. Environ. Res.* 44, 85–98. doi:10.1016/S0141-1136(96)00104-3

- Sze, P.W.C., Lee, S.Y., 1995. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar. Pollut. Bull.* 31, 390–393.
- Uri, D., Schifman, L. a, 2014. Nonpoint Source Pollution Assessment and Management of Air, Surface- and Groundwater in Rhode Island.
- Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., Silva, M.D., Randi, M. a F., Freire, C. a., Silva de Assis, H.C., Oliveira Ribeiro, C. a., 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environ. Res.* 105, 350–363. doi:10.1016/j.envres.2007.06.003
- Viñas, L., Franco, A., Blanco, X., Bargiela, J., Soriano, J.A., Perez-Fernandez, B., Gonzalez, J.J., 2012. Temporal and spatial changes of PAH concentrations in *Mytilus galloprovincialis* from Ria de Vigo (NW Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2), 529–539.
- Vikas, M., Dwarakish, G.S., 2015. Coastal Pollution: A Review. *Aquat. Procedia* 4, 381–388. doi:10.1016/j.aqpro.2015.02.051
- Weinstein, J.E., 1997. Fluoranthene-induced histological alterations in oysters, *Crassostrea virginica*: Seasonal field and laboratory studies. *Mar. Environ. Res.* 43, 201–218. doi:10.1016/0141-1136(96)00088-8
- Widdows, J., Bakke, T., Bayne, B.L., Donkin, P., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Evans, S. V, Moore, S.L., 1982. Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water-accommodated fraction of North Sea oil. *Mar. Biol.* 67, 15–31. doi:10.1007/BF00397090
- Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., 2016. Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44, 75–83. doi:10.1016/j.etap.2016.04.001
- Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., Miao, J., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 170, 50–59. doi:10.1016/j.cbpc.2015.02.003
- Zacchi, F.L., de Lima, D., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., de Miranda Gomes, C.H.A., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Dias Bairy, A.C., 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene at different salinities. *Aquat. Toxicol.* 183, 94–103. doi:10.1016/j.aquatox.2016.12.016
- Zacchi, F.L., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Lima, D., Lüchmann, K.H., Sasaki, S.T., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Montone, R.C., de Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., 2018. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliensis* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 135, 110–118. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.07.018

CAPÍTULO 3

3. ARTIGO 2: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PIRENO E FLUORENO EM OSTRAS *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG, 1789) EM DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS.

*Isis Mayna Martins dos Reis*¹; *Marília Nardelli Siebert*¹; *Flávia Lucena Zacchi*¹; *Jacó Joaquim Mattos*²; *Fabrizio Flores-Nunes*¹; *Guilherme de Toledo-Silva*³; *Clei Endrigo Piazza*¹; *Márcia Caruso Bicego*⁴; *Satie Taniguchi*⁴; *Claudio Manoel Rodrigues de Melo*⁵; *Afonso Celso Dias Bainy*¹

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

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

³Laboratório de Bioinformática, Departamento de Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Laboratório de Química Orgânica Marinha - LABQOM, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

Capítulo submetido na revista **Aquatic Toxicology** em 2020, juntamente com os dados apresentados na tese da doutoranda Marília Nardelli Siebert do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFSC. Dos Reis, I.M.M, Siebert, M.N., Zacchi, F.L., Mattos, J.J, Flores-Nunes, F.F., Toledo-Silva, G., Piazza, C.E., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Melo, C.M.R., Bainy, A.C.D., 2019. **Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - Part II.** *Aquat. Toxicol.*

3.1 RESUMO

O pireno (PIR) e o fluoreno (FLU) estão entre os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e são frequentemente detectados em locais contaminados. Devido à importância dos moluscos bivalves nos programas de biomonitoramento e às escassas informações sobre biomarcadores histopatológicos nestes organismos, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do PIR e do FLU na estrutura de diferentes tecidos da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*. As ostras *C. gigas* foram expostas por 24 e 96 horas a PIR (0,25 e 0,5 μM) e FLU (0,6 e 1,2 μM). Após a exposição, foram avaliadas a concentração de PIR e FLU em tecidos moles e as alterações histológicas nas ostras. O tempo de meia-vida do PIR na água foi menor que o fluoreno, o que está de acordo com a maior lipofilicidade do PIR. O estágio reprodutivo das ostras foi pós-desova (fase inativa) naquelas expostas a PIR. A exposição a PIR causou alterações histológicas, como atrofia tubular nos divertículos digestivos. Um número maior de células mucosas no manto foi observado nas ostras expostas à maior concentração de FLU, sugerindo mecanismos de defesa dessa espécie contra a exposição a FLU. As ostras expostas por 24h a FLU 1,2 μM estavam no estágio maduro de desenvolvimento gonadal e apresentaram níveis mais elevados de transcrição de diferentes genes relacionados a biotransformação de xenobióticos, sugerindo seu papel na biotransformação de FLU. Além disso, após 96 h de exposição a FLU, houve um aumento significativo de células mucosas nas ostras do manto. Esses resultados sugerem que os HPAs causam diferentes efeitos nos tecidos das ostras *C. gigas*, porém essas diferenças também podem estar relacionadas ao estágio reprodutivo.

Palavras-chave: bivalve, HPA, atrofia, muco, histopatologia.

3.2 ABSTRACT

Pyrene (PYR) and fluorene (FLU) are among the sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) of the United States Environmental Protection Agency and are often detected in contaminated sites. Due to the importance of bivalve molluscs in biomonitoring programs and the poor information on histopathological biomarkers in these organisms, the aim of this study was to investigate the effect of PYR and FLU on the structure of different tissues of in the Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Oysters *C. gigas* were exposed for 24 h and 96 h to PYR (0.25 and 0.5 μM) and FLU (0.6 and 1.2 μM). After exposure, the concentration of PYR and FLU in soft tissues and histological changes in oysters were evaluated. PYR half-life in water was shorter than FLU, which is in agreement with higher PYR lipophilicity. The reproductive stage of oysters was post-spawn (inactive phase) of oysters exposed to PYR. Exposure to PYR caused histological changes, such as tubular atrophy in the digestive diverticula. A larger number of mucous cells in the mantle were observed in oysters exposed to a higher concentration of FLU, suggesting defense mechanisms of this species against exposure to FLU. Oysters exposed for 24h to FLU 1.2 μM were in the mature stage of gonadal development and had higher levels of transcription of different genes, suggesting a role in FLU biotransformation. In addition, after 96 h of FLU exposure, there was a significant increase in mucous cells in the mantle of oysters. These results suggest that PAH cause different effects on oyster tissues, but these differences may also be related to the reproductive stage.

Keywords: Bivalve, PAH, atrophy, mucous, histopathology.

3.3 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho está exposto a uma grande variedade de contaminantes que, mesmo em níveis baixos, podem causar efeitos adversos ao ecossistema (Briaudeau et al., 2019). Os xenobióticos orgânicos presentes no meio marinho são um exemplo de compostos químicos com potencial ameaça para os seres humanos, animais aquáticos e ao ambiente, especialmente os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) que são conhecidos por serem imunotóxicos, teratogênicos e carcinogênicos (Martins et al., 2015).

Devido à sua toxicidade e onipresença no ambiente aquático, os HPA são considerados poluentes prioritários (Martins et al., 2015). Possuem dois ou mais anéis de benzeno fusionados e compõem um grupo de substâncias que constitui o petróleo (Douben, 2003), utilizado em plásticos, combustíveis, tintas, asfalto e em processos industriais, como na produção de fármacos e pesticidas (Abdel-Shafy; Mansour, 2015).

Os HPA estão comumente presentes no ambiente marinho como misturas. Contudo, como compostos individuais, podem conter mecanismos muito distintos de toxicidade, independentemente de similaridades químicas entre as classes (Mayer e Reichenberg, 2006, Martins et al., 2015). Substâncias como o fluoreno, de baixo peso molecular, formadas por três anéis, possuem elevada toxicidade aguda, porém baixo potencial carcinogênico. Já substâncias de maior peso molecular, contendo quatro anéis como o pireno, possuem baixa toxicidade aguda, mas apresentam um maior potencial carcinogênico (Kennish, 1997).

A exposição de animais aquáticos ao pireno pode causar alterações comportamentais, fisiológicas, reprodutivas e no desenvolvimento embrionário (Okay et al., 2006; Oliveira; Gravato; Guilhermino, 2012; Oliveira et al., 2013; Shirdel et al., 2016; Sun et al., 2008; Xie et al., 2017). A exposição ao fluoreno ocasiona em bivalves e peixes diversos efeitos fisiológicos, comportamentais e em nível de população e comunidade (Boyle et al., 1985; Finger et al., 1985; Gonçalves et al., 2008; Sinaei, 2013).

Diante do aporte constante de HPA no meio aquático, e dos efeitos adversos ocasionados por esses contaminantes, os bivalves têm sido utilizados mundialmente em programas de biomonitoramento com o objetivo de avaliar a presença e os efeitos destes compostos em diferentes escalas espaço-temporais no meio aquático (Arienzo et al., 2019; Schöne; Krause, 2016; Thebault et al., 2007). De fato, bivalves como as ostras *Crassostrea gigas*, são frequentemente utilizadas, principalmente devido à sua alta capacidade de bioconcentração, característica do seu estilo de vida sésil e hábito filtrador (Schöne; Krause, 2016; Arienzo et al., 2019).

Em programas de biomonitoramento ambiental, as análises químicas de quantificação de contaminantes nos tecidos moles de organismos podem ser relacionadas às análises de alterações biológicas, que denotam parâmetros de exposição ou efeito (e.g. dano histológico) desses contaminantes nos organismos. Nesse contexto, além de seu papel no fornecimento de uma "linha de base" na medida de saúde, a histopatologia tem sido empregada para investigar danos teciduais relacionados à exposição aos HPA, PCB e metais pesados em bivalves (Arienzo et al., 2019; Kluytmans et al., 1988; Marigómez et al., 2006). Mudanças nas alterações morfofuncionais de espécies de bivalves foram investigadas, principalmente com enfoque em estudos de histopatologia do divertículo digestivo e gônada, considerados órgãos importantes para avaliar o estado de saúde animal (Garmendia et al., 2011; Costa et al., 2013).

Tecidos como manto, brânquia e o divertículo digestivo de ostras também têm sido estudados como órgãos-alvo de alterações após exposição aos HPA (Dos Reis et al., 2015; Zacchi et al., 2019). Esses tecidos são considerados como as duas principais vias de captação dessas substâncias. A primeira é a brânquia, considerada como a via de captação direta da fração solúvel dos HPA na água e, a segunda, é a assimilação através do trato digestivo, a rota indireta de absorção da menor fração de HPA do sedimento (Arienzo et al., 2019). Estudos que abordam o efeito em nível de dano tecidual em moluscos bivalves após exposição de HPA são escassos (Cappello et al., 2013a,b; Fasulo et al., 2012). Portanto, a avaliação com enfoque nos efeitos de cada HPA, separadamente, permite elucidar o mecanismo de ação dessas moléculas e prever possíveis efeitos no nível do organismo e da população.

Paralelamente ao nosso primeiro estudo sobre os efeitos de PIR e FLU nas ostras *Crassostrea gasar* (Zacchi et al., 2019), este artigo constitui a parte II de uma série de duas partes. Desse modo, na segunda parte, foram observados os efeitos desses HPAs ao nível de alteração tecidual nas ostras *Crassostrea gigas*. Estes estudos podem, em vista disso, disponibilizar uma compreensão abrangente desses mecanismos em duas espécies de moluscos economicamente importantes, e representam uma oportunidade para a descoberta de novos biomarcadores histológicos de exposição e efeito aos HPA.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Delineamento experimental e exposição a Pireno e Fluoreno

Ostras *Crassostrea gigas* ($10,0 \pm 1,8$ cm) foram adquiridas em uma fazenda comercial de aquicultura localizada no Ribeirão da Ilha, Florianópolis, Santa Catarina, sul do

Brasil e transportadas para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação e Imunoquímica Aquática da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/ UFSC). Um total de duzentos e dezesseis ostras foram utilizadas neste experimento. Para exposição ao pireno, ostras (n = 108) foram aclimatadas por sete dias em um tanque de 150 L, em um sistema de recirculação contínua de água, mantidas sob condições controladas: salinidade (25 ‰), temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1,3^{\circ}\text{C}$), pH ($7,8 \pm 0,2$), amônia ($<0,25$) e fotoperíodo (12 h: 12 h). Durante a aclimação, a alimentação foi realizada com microalgas comerciais (Microbe Lift Phyto Plus-B) na proporção de $200 \cdot 10^6$ células.ostra⁻¹ (*Nitzschia closterilum*, *Chaetoceros sp.*, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella sp.*), a cada 36 horas. O mesmo protocolo de alimentação durante o processo de aclimação e exposição aos contaminantes, assim como todo o delineamento de exposição a pireno (PIR) e fluoreno (FLU) e de dissecação dos tecidos para análises químicas, histológicas e moleculares, foram realizados seguindo a mesma metodologia descrita no capítulo 2.

3.4.2 Concentração de PIR E FLU na água dos tanques

A concentração de PIR e FLU na água, de cada grupo controle ou exposto, foi monitorada por fluorimetria nas primeiras 24 horas de exposição. Paralelamente aos tanques com ostras, a depleção de PIR e FLU foi medida em um tanque para cada HPA dentro do mesmo grupo exposto, mas sem ostras. O monitoramento da fluorescência de PIR foi realizado no comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão de 382 nm e FLU com excitação em 258 nm e emissão de 313 nm. As análises foram realizadas usando espectrofluorímetro (Spectramax M5) no módulo de leitura de cubetas, imediatamente após a coleta de 1 mL de água de cada tanque. Uma curva de referência padrão foi feita a partir de 2 mg. L⁻¹ das soluções de PIR ou FLU, após uma diluição em série para obter a concentração de cada HPA. As amostras foram coletadas a cada 15 minutos, durante a primeira hora de exposição; a cada 30 minutos, durante 2 horas subsequentes; a cada hora, durante as 8 horas subsequentes e após 24 horas de exposição. A meia-vida de cada HPA nos tanques foi calculada com base na equação de regressão exponencial.

3.4.3 Concentração de PIR E FLU nos tecidos moles de *C. gigas*

A quantificação de PIR e FLU foi realizada em pools de tecidos moles de *C. gigas* de cada tratamento após 24 e 96 h de exposição. As amostras foram liofilizadas, e 1 g de ostras

liofilizadas (Thermo Savant, liofilizador modulyoD, Waltham, MA, EUA) foram extraídas em um extrator Soxhlet com n-hexano e diclorometano a 50% (v / v), de acordo com MacLeod et al. (1985), com pequenas modificações. O protocolo para quantificação de PIR e FLU seguiu a mesma metodologia descrita no capítulo 2.

3.4.4 Preparação dos tecidos para análise histológica

As ostras, controle e tratadas, foram removidas de suas conchas (6 animais/tratamento), cortadas transversalmente e imediatamente fixadas em formalina tamponada a 4% (0,1 M, pH 7,3), durante 48h a 20°C (Howard et al., 2004). Em seguida, as amostras foram desidratadas através de uma série progressiva de etanol, infiltradas intermediariamente por xilol e embebidas em parafina (60°C). Foram realizados cortes histológicos (5µm de espessura), montados em lâminas de vidro para histologia de rotina. As lâminas foram analisadas às cegas para eliminar o viés do observador. Os tecidos foram corados em hematoxilina de Harris e eosina (HHE) para visualizar características morfológicas típicas, examinados em microscopia óptica. A coloração histoquímica com Alcian Blue (pH 2,5) foi realizada para detectar a presença de células mucosas (mucócitos) no manto, seguindo a metodologia de Cargnin-Ferreira e Sarasquete (2008), com quantificação adicional utilizando o software ImageJ2 (Versão 2.0.0-rc -64, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). As alterações dos divertículos digestivos foram avaliadas semi-quantitativamente, de acordo com Ellis et al. (1998). As ostras foram classificadas em fases distintas de estágio gonadal, seguindo os critérios estabelecidos por Mann (1979).

3.4.5 Estatística dos dados

Utilizou-se um desenho estatístico hierárquico nas análises histológicas. Normalidade e homoscedasticidade dos dados foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A avaliação da atrofia tubular nos divertículos digestivos das ostras expostas a PIR ou FLU, por 24 e 96 horas, foi realizada aplicando um teste não paramétrico com permutação, valendo-se do procedimento multitestes com correção de Bonferroni (Westfall et al., 1999). Foram utilizados os mesmos testes na análise das células mucosas no manto. As diferenças significativas entre os grupos foram definidas como $p < 0,05$. Para todas as análises, não foram observados efeitos dos tanques. Todas as análises estatísticas foram realizadas com os softwares GraphPad Prism® 8, Statistica 7® e SAS®.

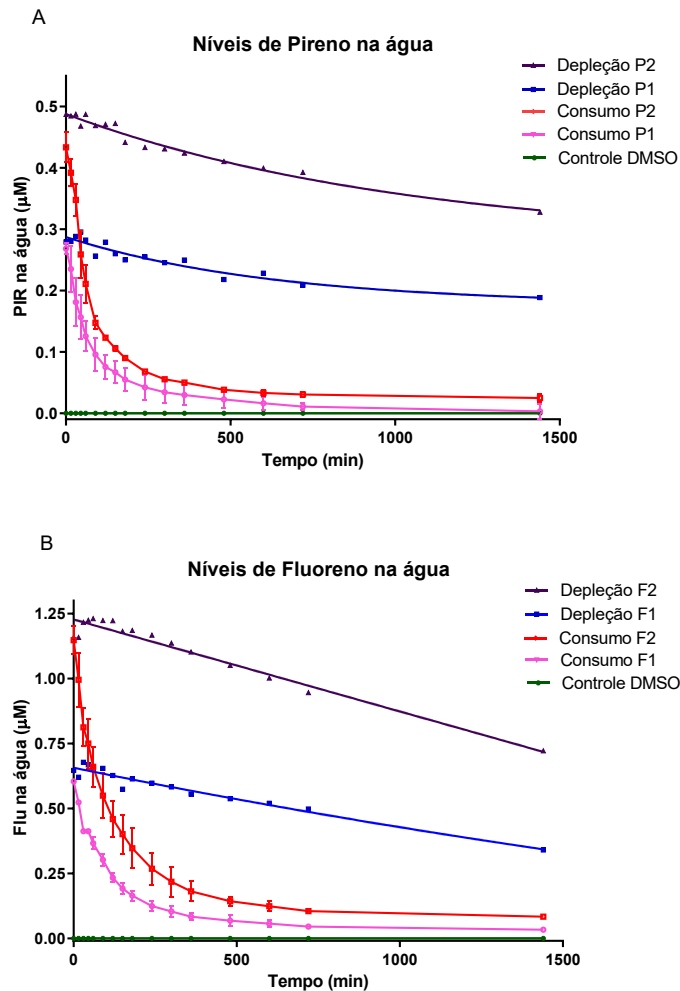
3.5 RESULTADOS

3.5.1 Concentração de PIR E FLU na água dos tanques

Após 24 h de exposição, os níveis de PIR na água contendo ostras diminuíram 98% de $0,27 \pm 0,009 \mu\text{M}$ para $0,005 \pm 0,01 \mu\text{M}$ no grupo P1 e da mesma forma no grupo P2 (95%) de $0,44 \pm 0,02 \mu\text{M}$ para $0,02 \pm 0,006 \mu\text{M}$. No tanque sem ostras, os níveis de PIR na água diminuíram de $0,28 \mu\text{M}$ para $0,19 \mu\text{M}$ (32,1%) no grupo P1 e uma diminuição semelhante (32,3%) ocorreu no grupo P2 (de $0,48 \mu\text{M}$ para $0,33 \mu\text{M}$) (Fig.8A). A meia-vida do PIR no tanque com ostras foi de 55 minutos (P1) e 54 minutos (P2).

Nos tanques de FLU, ocorreu uma diminuição semelhante de 94,6 e 92,7% para os grupos F1 e F2 (de $0,60 \pm 0,002 \mu\text{M}$ para $0,03 \pm 0,002 \mu\text{M}$ e $1,15 \pm 0,05 \mu\text{M}$ para $0,08 \pm 0,0009 \mu\text{M}$, respectivamente). No tanque sem ostras, os níveis de FLU diminuíram de $0,64 \mu\text{M}$ para $0,33 \mu\text{M}$ (47,2%) em F1 e de $1,15 \mu\text{M}$ para $0,72 \mu\text{M}$ (37,5%) em F2. Nos grupos controle, os níveis de PIR ou FLU estavam abaixo do limite de detecção do método (Fig. 1B). A meia-vida da FLU no tanque contendo ostras foi de 79 min (F1) e 77 min (F2), respectivamente.

Figura 8: Concentração de pireno (PIR) e fluoreno (FLU) medidos por fluorescência na água dos tanques com (Consumo) ostras ou sem (Depleção) ostras *Crassostrea gigas*, durante 24 h de exposição: (A) Experimento de exposição ao PIR 0,25 μM (P1) e 0,5 μM (P2) e Controle com DMSO, sem ostras; (B) Experimento de exposição ao FLU 0,6 μM (F1) e 1,2 μM (F2) e Controle com DMSO, sem ostras.



Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Siebert (2017)

3.5.2 Concentração de PIR E FLU nos tecidos de *C. gigas*

Nos grupos expostos, após 24 h, os níveis de PIR nos tecidos moles de ostra foram de 37,88 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P1) e 55,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P2), respectivamente. Após 96 h de exposição, os níveis aumentaram com o tempo de exposição e foram de 49,66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P1) e 93,34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P2), respectivamente (Fig. 9A). Nos grupos expostos à FLU, os níveis foram de 10,10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (F1) e 11,10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (F2) após 24 h de exposição. Após 96 h de exposição, os níveis de FLU, como na PIR, aumentaram com o tempo de exposição e foram de 29,53 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (F1) e 39,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (F2),

respectivamente (Fig. 9B). A concentração de PIR e FLU nos tecidos moles das ostras dos grupos controle e tempo zero (T0) foi inferior a 1 µg / g de tecido seco em todos os períodos e tratamentos.

Tabela 3: Concentração de PIR e FLU (µg.g peso seco⁻¹) em tecidos moles de *Crassostrea gigas* em 24 e 96 horas de exposição: controle; pireno 0,25 µM (P1) e 0,5 µM (P2); fluoreno 0,6 µM (F1) e 1,2 µM (F2).

| Período | Tratamento | | | | | |
|---------|------------|------------------------|-------|----------|------------------------|-------|
| | Controle | PIR µg.g ⁻¹ | | Controle | FLU µg.g ⁻¹ | |
| | | P1 | P2 | | F1 | F2 |
| 24h | 0,001 | 37,88 | 55,07 | 0 | 10,10 | 11,10 |
| 96h | 0,003 | 49,66 | 93,34 | 0,001 | 29,53 | 39,07 |

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

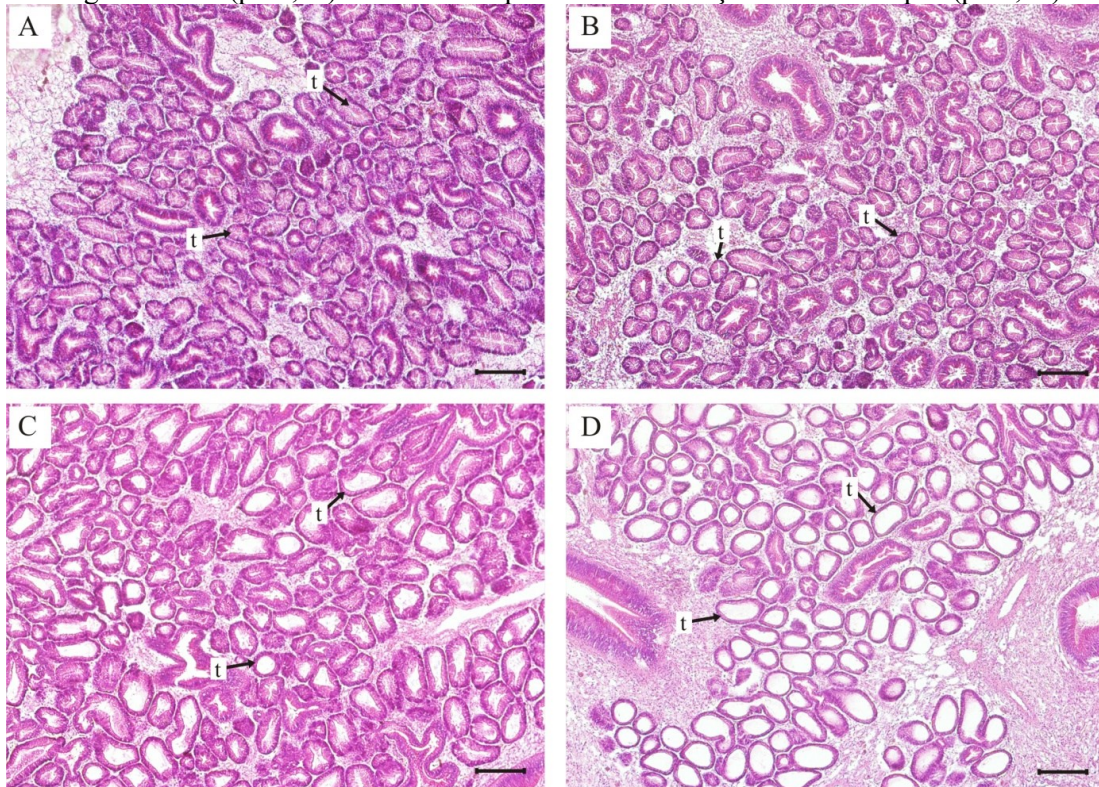
3.5.3 Histologia

A análise microscópica revelou alterações na estrutura tecidual dos divertículos digestivos e manto de ostras expostas à PIR e FLU.

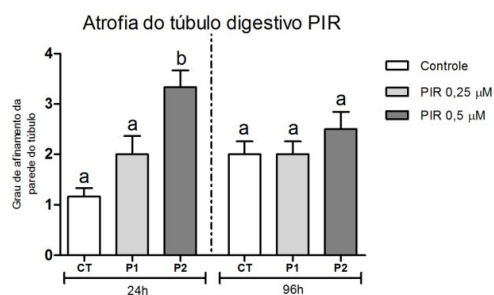
Nos divertículos digestivos de *C. gigas* expostas por 24 h a PIR, os níveis de atrofia tubular apresentaram um aumento significativo no grupo P2 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (Fig.10). O mesmo padrão não foi observado após 96h de exposição, onde não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Após 24 e 96h de exposição a FLU, não foram observadas alterações nos divertículos digestivos das ostras expostas a FLU. Hipertrofia, hiperplasia, células marrons, inflamações, infiltrações hemocitárias ou parasitas não foram observados nos divertículos digestivos das ostras.

No manto de ostras expostas a PIR não houve diferenças significativas na porcentagem de células mucosas entre os tratamentos. No entanto, com o aumento no período de exposição foi observado um aumento na porcentagem de células mucosas no manto das ostras expostas a PIR ($p < 0,05$) (Fig.11E). Após 96 h de exposição ao FLU, a porcentagem de células mucosas apresentou um aumento significativo no grupo F2 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (Fig.4F). A identificação prévia do sexo das ostras não foi realizada neste experimento. Através do exame histológico da gônada, foi observado que a maioria das ostras expostas a FLU eram machos na fase madura do desenvolvimento reprodutivo. As ostras expostas a PIR encontravam-se em estágio inativo (indeterminado) de desenvolvimento gonadal e o sexo não pôde ser definido (Fig. 12).

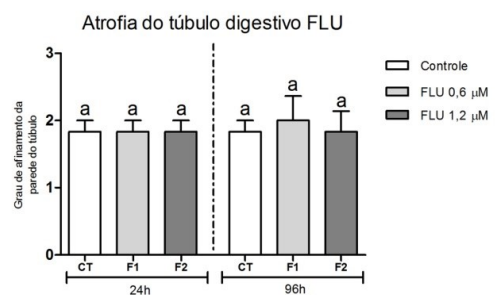
Figura 9: Atrofia dos túbulos digestivos de ostras *C. gigas* expostas aos HPAs (PIR e FLU) por 24 e 96 h e grupos controle: (A) Túbulos digestivos normais (t), sem atrofia nas ostras do grupo controle; (B) túbulos digestivos (t) com baixo grau de atrofia (ostras expostas a P1, 24h); (C) Túbulos digestivos (t) com grau moderado de atrofia (ostras expostas a P2, 96h); (D) Túbulos digestivos com forte grau de atrofia, parede extremamente fina (ostras expostas a P2, 24h). Barras: 100 μ m; Coloração: HHE; Análise semi-quantitativa da atrofia tubular nos divertículos digestivos das ostras *C. gigas* expostas a duas concentrações de PIR (C) e FLU (D) por 24 e 96 h e grupos controle. O grau de atrofia foi classificado de acordo com dos Reis et al. (2015) e Ellis et al. (1998) como 0–1 (túbulo normal), 1–2 (presença baixa), 2–3 (presença moderada), 3–4 (presença forte). Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Asteriscos representam diferenças entre os tempos ($p < 0,05$).



E

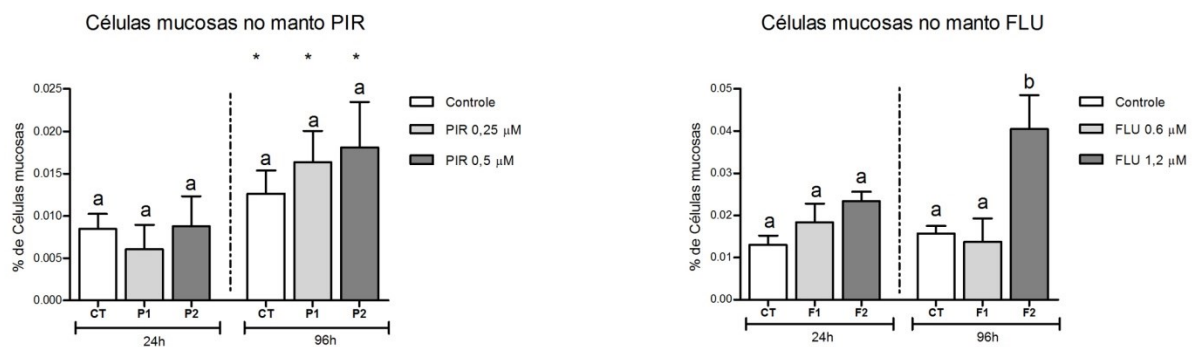
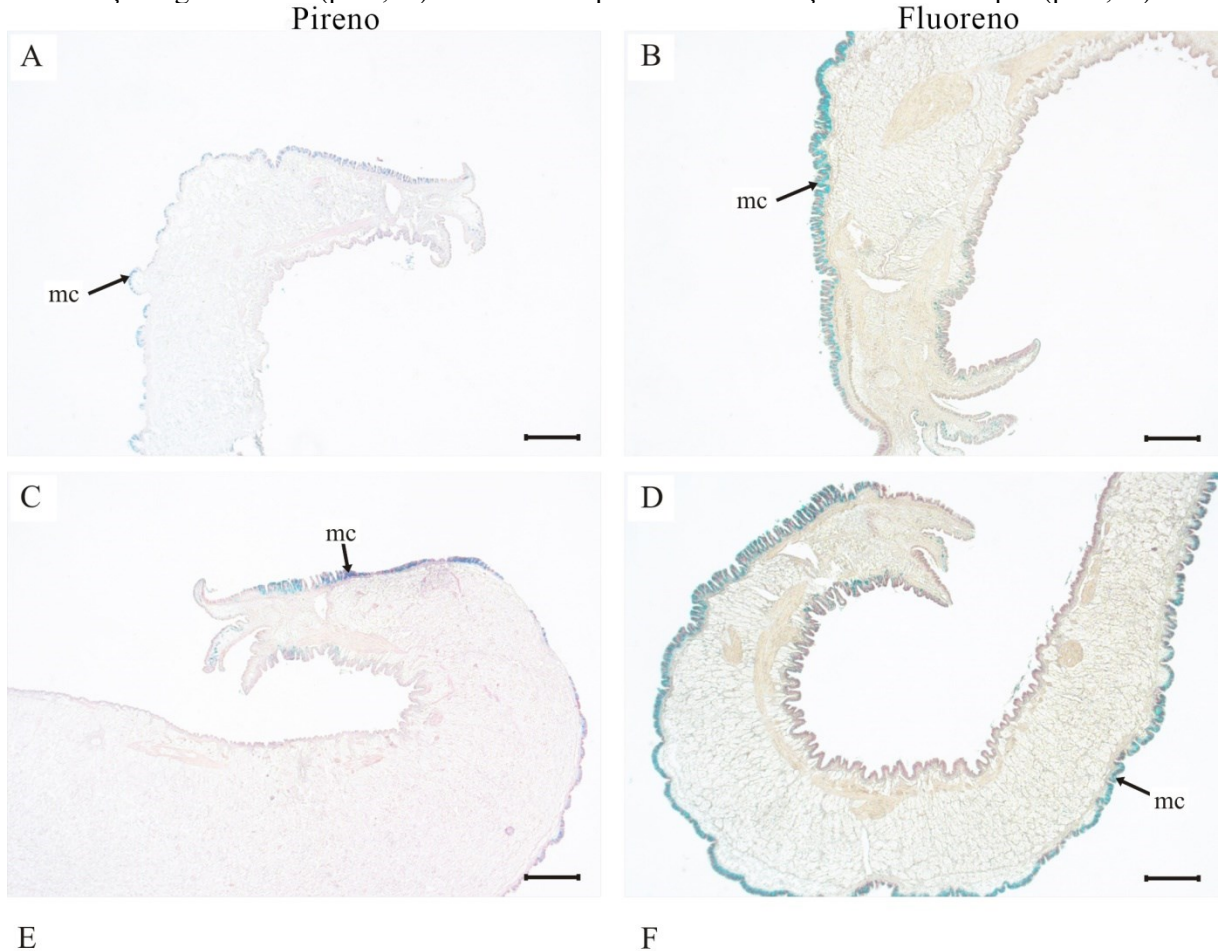


F



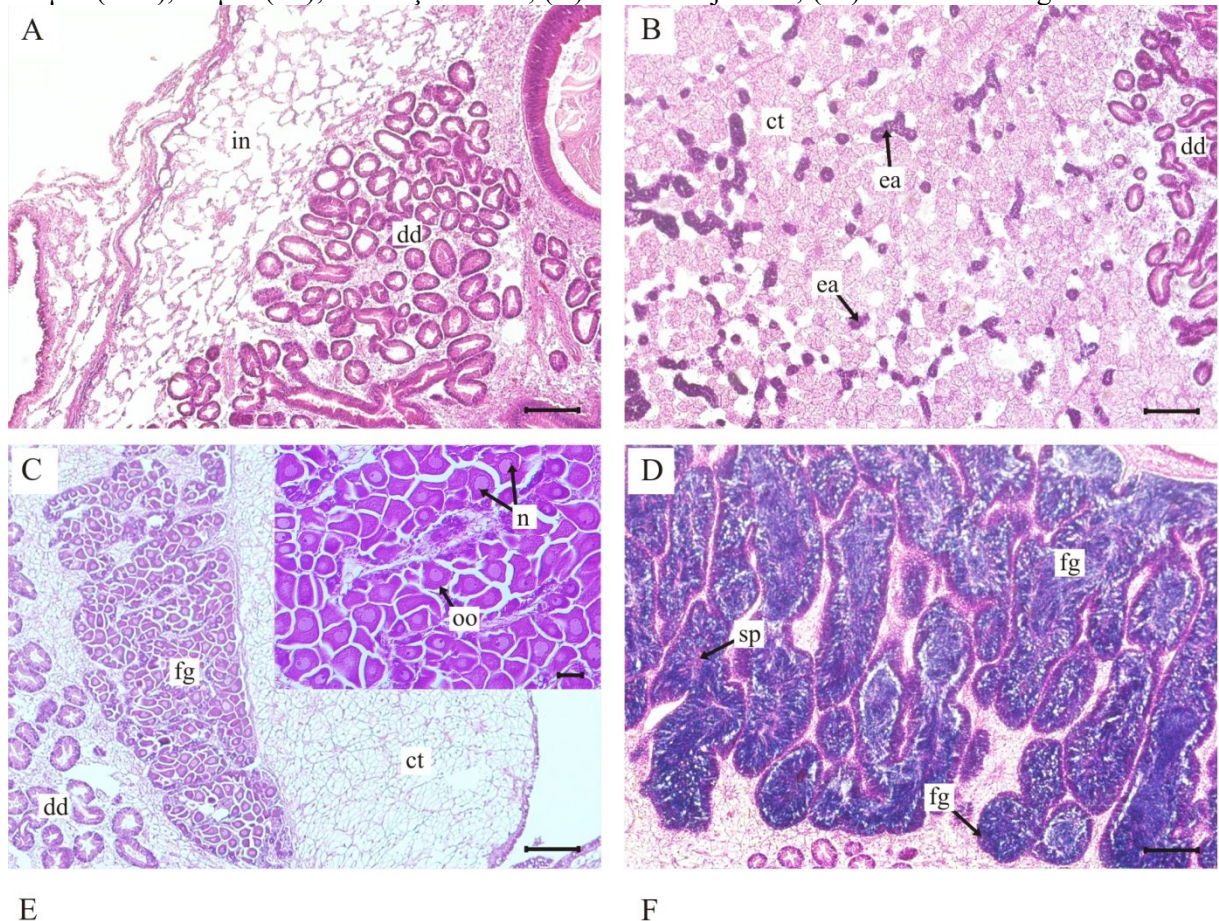
Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Figura 10: Presença de células mucosas no manto de ostras *C. gigas* expostas a PIR e FLU por 24 e 96 h e grupos controle: (A) Presença de células mucosas (MC) na borda do manto de ostra (grupo controle, PIR, 24h), destacado em azul; (B) detalhe (azul) na borda do manto da ostra (grupo controle FLU, 96h); (C) detalhe (azul) na borda do manto da ostra (grupo P1, 96h) e (D) detalhe (azul) na borda do manto de ostra exposta a F2, 96h. Barras: 100 μ m; Coloração: Alcian Blue; Porcentagem de células mucosas na borda do manto de ostras *C. gigas* expostas por 24 e 96 h a duas concentrações de PIR (E) e FLU (F) e grupos controle. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Asteriscos representam diferenças entre os tempos ($p < 0,05$).

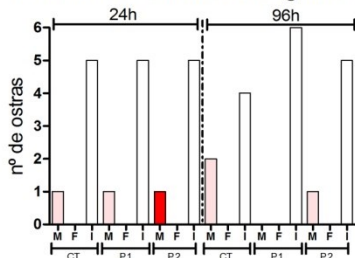


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

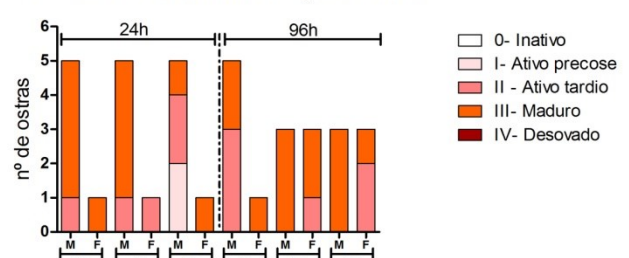
Figura 11: Estádios de desenvolvimento gonadal da ostra *C. gigas* expostas PIR e FLU por 24 e 96 h e grupos controle: (A) estágio inativo (in) das gônadas (grupo controle PIR, 24 h); (B) estágio ativo inicial de machos (P1, 24 h); (C) O estágio maduro de fêmeas, detalhe das células foliculares contendo oócitos predominantemente livres (oo) com distintos núcleos e nucléolos (n) (grupo controle FLU, 96 h); (D) estágio maduro de gônadas de machos com folículos (fg) preenchidos com espermatozoides (sp) (F1, 96 h); Gráfico dos diferentes estádios de desenvolvimento gonadal (inativo/indeterminado, ativo precoce, ativo tardio, maduro e desovado) do macho (m), fêmea (f) e indeterminado (I) ostras expostas a (E) PIR e (F) FLU por 24 e 96 h e grupos controle. Barras: 100 μ m (A-D), 20 μ m (Cc); Coloração: HHE; (ct) tecido conjuntivo; (dd) divertículos digestivos.



Estádio de desenvolvimento gonadal - PIR



Estádio de desenvolvimento gonadal - FLU



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

3.6 DISCUSSÃO

Nos bivalves, alterações teciduais no divertículo digestivo e no manto podem ser potenciais biomarcadores histológicos de efeito e exposição de contaminação aquática,

principalmente para contaminantes constantemente presentes nesses ambientes, como os HPA. O principal objetivo deste estudo foi avaliar possíveis danos nos níveis de estrutura no tecido do divertículo digestivo e no manto das ostras *C. gigas* expostas em laboratório a duas concentrações de PIR e FLU. Além disso, foram avaliados os níveis de concentração de PIR e FLU na água dos tanques por fluorescência, juntamente com análises químicas nos tecidos das ostras, antes e após 24 e 96h de exposição aos HPA.

Neste estudo, ostras *C. gigas* bioconcentraram PIR e FLU. A diminuição na concentração de ambos HPA na água dos tanques com ostras após 24 e 96h de exposição ocorreu associada à absorção de PIR e FLU, respectivamente (Fig. 8). Concomitantemente, foram observadas maiores concentrações desses HPAs nos tecidos das ostras após 96h de exposição, quando comparado ao grupo controle (Tabela 3). Logo, independente do HPA, a concentração de PIR e FLU foi maior nos tecidos dos grupos expostos aos maiores períodos de tempo e concentrações. Por serem sésseis, filtradores e apresentarem baixa metabolização de HPA (Bustamante et al., 2012; Gosling, 2003), a bioconcentração dessas substâncias é favorecida em bivalves. Esse processo também é observado em ostras expostas a doses únicas de HPA em laboratório (Dos Reis et al., 2015; Zacchi et al., 2017; Lima et al., 2018).

Sabe-se que ostras *C. gigas* têm a capacidade de rapidamente absorver HPA dissolvidos em água (Bustamante et al., 2012). Assim como em nosso estudo anterior com a ostra *C. gasar* (Zacchi et al., 2019), uma maior meia-vida foi observada nas ostras expostas a 0,6 μM de FLU, em comparação com PIR, quando expostos a mesma concentração (Fig. 8), o que está de acordo com a biodisponibilidade desses HPAs em soluções aquosas. PIR tem maior coeficiente de partição octanol-água do que FLU e é mais lipofílico (Bruggeman et al., 1982; Miller et al., 1985; Sangster, 1989), o que reflete em sua maior capacidade de bioconcentração (Sikkema et al., 1994, 1995), suscitando um maior risco de respostas histopatológicas nas ostras expostas a este contaminante.

Alterações histopatológicas são poderosos indicadores de exposição aos estressores ambientais e são o resultado de alterações bioquímicas e fisiológicas adversas em um organismo (Aarab et al., 2008). As análises morfológicas, neste estudo, evidenciaram alterações como, atrofia nos túbulos do divertículo digestivo e um aumento na presença de células mucosas no manto de ostras *C. gigas*, expostas a PIR e FLU respectivamente.

A atrofia do divertículo digestivo é uma condição causada pelo afinamento do epitélio dos túbulos digestivos nos bivalves marinhos e pode ser causada por contaminação da água, má condição nutricional e estresse da desova (Kang, 2010; Couch, 1984). Em nosso estudo, a análise morfológica do divertículo digestivo evidenciou atrofia nos túbulos

digestivos de ostras *C. gigas* expostas a PIR (Fig. 3A), associadas ao estágio reprodutivo pós-desova (estádio inativo) (Fig.11E). Ostras em estágio maduro expostas a FLU (Fig.11F) não apresentaram diferenças significativas no grau de atrofia tubular (Fig. 9B), o que sugere a influência do estado reprodutivo na atrofia tubular. Entretanto, devido aos diferentes estádios reprodutivos observados nas ostras expostas a PIR e FLU, e por não possuírem diferenças com seus respectivos grupos controle, considera-se que novos experimentos de exposição devem ser realizados com ostras *C. gigas* de mesmo estágio reprodutivo para, possivelmente, evidenciar o efeito destes contaminantes com o grau de atrofia tubular.

Adicionalmente ao estágio reprodutivo, a alimentação artificial também pode ter causado atrofia tubular nas ostras. Como observado no estudo anterior com a ostra *C. gasar* (Zacchi et al., 2019), as ostras *C. gigas* foram alimentadas com níveis adequados de biomassa artificial, porém supõem-se que a digestibilidade e os micronutrientes essenciais da ração artificial podem ter sido insuficientes para suprir o balanço energético desses animais, ocasionando a atrofia tubular, tanto das ostras do grupo controle, quanto das expostas ao PIR e ao FLU.

No manto, a presença significativa de muco foi observada em ostras *C. gigas*. O período de exposição influenciou em um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células mucosas no manto de ostras expostas a PIR (Fig. 10E). Além disso, ostras concentraram uma maior quantidade desse contaminante após 96h de exposição (Tabela 3). Após exposição a FLU, ostras *C. gigas* mostraram um aumento significativo de células mucosas ($p < 0,05$), em comparação ao grupo controle (Fig. 10F). O aumento de células mucosas já foi observado em brânquias de *M. galloprovincialis*, *M. falcata* e *C. rhizophorae* coletados em local poluído (Fasulo et al., 2008; David et al., 2008; Valdez Domingos et al., 2007), no manto de *C. gasar* e *M. edulis* expostos a fenantreno (dos Reis et al., 2015; Moore et al., 1984), no manto de *C. gasar* expostos a PIR e FLU (Zacchi et al., 2019), e tem sido sugerido que o aumento de secreção mucosa nesses tecidos constitui um mecanismo de defesa contra a exposição a contaminantes aquáticos (Bigas et al., 2001). Nos bivalves, a secreção mucosa normal auxilia na alimentação, na locomoção, navegação e defesa contra predadores, e sua principal função é a proteção dos órgãos contra danos físicos, químicos e biológicos (Schmidt-Nielsen et al., 1971; Hargens e Shabica, 1973). Em vista disso o aumento crescente da quantidade de muco secretado por estes animais pode demonstrar exposição a condições adversas.

Neste estudo, os resultados sugerem que a exposição a FLU pode ter causado o aumento da secreção mucosa no manto. De acordo com Marigómez et al. (2002), o muco

secretado em bivalves pode promover a captação epitelial de contaminantes na tentativa de remoção desses compostos para o meio extracelular.

3.7 CONCLUSÃO

O pireno, por ter menor solubilidade em água em relação ao fluoreno, pode estar associado ao menor tempo de meia-vida desse HPA na água dos tanques com ostras, e a maior bioconcentração observada nos tecidos das ostras *C. gigas*. A exposição ao pireno causou alterações histológicas, como atrofia tubular em divertículos digestivos e o estágio reprodutivo foi de pós-desova (fase inativa) nas ostras expostas. Quando expostas a fluoreno as ostras *C. gigas* em estágio maduro de maturação gonadal não apresentaram alterações nos divertículos, porém apresentaram um aumento nas células mucosas no manto, demonstrando um mecanismo de defesa da espécie contra a exposição a esse HPA. Esses resultados sugerem que pireno e fluoreno causam diferentes efeitos nos tecidos das ostras *C. gigas* e que os estádios reprodutivos podem potencialmente influenciar a forma como as ostras respondem à exposição aos HPA. Mais estudos deverão ser conduzidos para avaliar o efeito de estádios reprodutivos em ostras *C. gigas*.

REFERÊNCIAS

- Aarab, N., Pampanin, D.M., Naevdal, A., Øysaed, K.B., Gastaldi, L., Bechmann, R.K., 2008. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). *Mar. Pollut. Bull.*, 57, 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.045>
- Abdel-Shafy, H. I.; Mansour, M. S. M. 2015. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Petrol.* 25, 1, 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Arienzo, M., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Ferrara, L., Stanislao, C., Donadio, C., Grazia, V., Gionata, V., Carella, F. Contaminants bioaccumulation and pathological assessment in *Mytilus galloprovincialis* in coastal waters facing the brownfield site of Bagnoli, Italy. 2019. *Mar. Pol. Bul.* 140, 341–352.
- Bigas, M., Duefort, M., Poquet, M., 2001. Cytological effects of experimental exposure to hg on the gill epithelium of the European oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. *Tissue Cell*, 33 (2), 178–188. <https://doi.org/10.1054/tice.2000.0169>

- Boyle, T.P. et al. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorene—Part II: Effects on the Ecological Structure and Function of Experimental Pond Ecosystems. ASTM International, 1985.
- Briaudeau, T., Zorita, I., Cuevas, N., Franco, J., Marigómez, I., Izagirre, U., 2019. Multi-annual survey of health status disturbance in the Bilbao estuary (Bay of Biscay) based on sediment chemistry and juvenile sole (*Solea* spp.) histopathology. *Mar. Pol. Bul.* 145, 126–137.
- Bruggeman, W.A.; Van Der Steen, J.; Hutzinger, O. 1982. Reversed-phase thin-layer chromatography of polynuclear aromatic hydrocarbons and chlorinated biphenyls: Relationship with hydrophobicity as measured by aqueous solubility and octanol-water partition coefficient. *J. Chromatogr A*, 238, 335-346. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81319-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81319-9)
- Bustamante, P., Luna-Acosta, A., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M. 2012. Bioaccumulation and metabolism of ¹⁴C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere*, 87, 938–944. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.049>
- Cappello, T., Maisano, M., D'Agata, A., Natalotto, A., Mauceri, A., Fasulo, S., 2013a. Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar. Environ. Res.* 91, 52–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.12.010>.
- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Lo Paro, G., Messina, G., Fasulo, S., 2013b. Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 132–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.019>.
- Cargnin-Ferreira, E., Sarasquete, C., 2008. *Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Costa, P.M., Carreira, S., Costa, M.H., Caeiro, S., 2013. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat. Toxicol.* 126, 442–454.
- Couch, J.A., 1984. Atrophy of Diverticular Epithelium as an Indicator of Environmental Irritants in the Oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 14, 525–526.
- David, J.A.D.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. *Micron.* 39, 1293–1299. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.001>
- Dos Reis, I.M.M., Mattos, J.J., Garcez, R.C., Zacchi, F.L., Miguelão, T., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M., Cargnin-Ferreira, E., Bainy, A.C.D., 2015 Histological responses and localization of the cytochrome P450 (*CYP2A1*) in *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 169, 79-89. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.011>
- Douben, P.E.T. Introduction. In: DOUBEN, P.E.T. (Ed). PAH: An Ecotoxicological Perspective. Chichester: Wiley, 2003. 407p.

- Ellis, M.S., Barber, R.D., Hillman, R.E., Kim, Y., Powell, E.N., Port Norris, N.J., 1998. Histopathology analysis. Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993–1996 Update, pp. 198.
- Fasulo, S., Mauceri, a, Giannetto, a, Maisano, M., Bianchi, N., Parrino, V., 2008. Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. *Aquat. Toxicol.* 88, 62–8.
<http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.03.009>
- Finger, S.E. et al. 1985. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorence—Part I: Effects of Fluorence on the Survival, Growth, Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests. *ASTM International*. <http://doi.org/10.1520/STP35258S>
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 2011. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *J. Environ. Monit.* 13, 915–932.
- Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D. 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ. Res.*, 108, 205–213.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.008>
- Gosling, E. Morphology of Bivalves. In: Gosling, E., Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Oxford: Fishing News Books, 2003. 443p.
- Hargens, A.R., Shabica, S.V., 1973. Protection against lethal freezing temperatures by mucus in an Antarctic limpet. *Cryobiology*. 10, 331–337. [http://doi.org/10.1016/0011-2240\(73\)90052-7](http://doi.org/10.1016/0011-2240(73)90052-7)
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans, 5. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, pp. 218.
- Kang, Do-Hyung, Chu, Fu-Lin E., Yang, Hyun-Sung, Lee, Chang-Ho, Koh, Hyeong-Beom, Choi, Kwang-Sik, 2010. Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the Southern Coast of Korea. *J. Shellfish Res.* 29 (4), 839–845. <https://doi.org/10.2983/035.029.0418>.
- Kennish, M. (1997). Practical handbook of estuarine and marine pollution. Petralia Publications, Boca Raton. p.523.
- Kluytmans, J.H., Brands, F., Zandee, D.I., 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.* 24, 189–192.
- Lee, K.M., Kruse, H., Wassermann, O., 1996. Seasonal fluctuation of organochlorines in *Mytilus edulis* L. from the south west Baltic Sea. *Chemosphere* 32, 1883–1895.
- Lima, D., Zacchi, F.L., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Gomes, C.H.A. de M., de Mello, Á.C.P., Siebert, M.N., Piazza, C.E., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bicego, M.C., Bebianno, M.J., de Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., 2018. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. *Chemosphere* 209, 307–318.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.094>.

- MacLeod, W.D., Brown, D.W., Fiedman, A.J., Burrows, D.G., Maynes, O., Pearce, R.W., Wilgren, C.A., Bogar, R.G. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, 121.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 59, 95-110. <http://doi.org/10.1017/s002531540004340x>
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56,358–392, <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.10040>.
- Marigómez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L., Cajaraville, M.P., 2006. Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign). *Mar. Pollut. Bull.* 53, 287–304.
- Martins, M., Santos, J.M., Diniz, M.S., Ferreira, A.M., Costa, M.H., Costa, P.M., 2015. Effects of carcinogenic versus non-carcinogenic AHR-active PAHs and their mixtures: Lessons from ecological relevance. *Environ. Res.* 138, 101–111.
- Mayer, P., Reichenberg, F., 2006. Can highly hydrophobic organic substances cause aquatic baseline toxicity and can they contribute to mixture toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2639–2644.
- Miller, M.M., Wasik, S.P., Huang, G.L., Shiu, W.Y., Mackay, D. 1985. Relationships Between Octanol-Water Partition Coefficients and Aqueous Solubility. *Environ. Sci. Technol.* 19, 522-529. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(85\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0273-2300(85)90007-8)
- Moore, M.N., Widdows, J., Cleary, J.J., 1984. Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: interactive effects. *Mar. Environ. Res.* 14,167–183, [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(84\)90077-1](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(84)90077-1).
- Okay, O.S. 2006. Effects of pyrene on mussels in different experimental conditions. *Environ Int*, 32, 538– 544. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.12.005>
- Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L., 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecol Indic*, 34, 641–647. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.019>
- Oliveira, M.; Gravato, C.; Guilhermino, L. 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecol Indic*, 19, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.08.006>
- Sangster, J., 1989. Octanol-water partition coefficients for simple organic compounds. *J. Phys. Chem.* 18,1111-1229. doi:10.1063/1.555833
- Shirdel, I. et al. 2016. The response of thyroid hormones, biochemical and enzymological biomarkers to pyrene exposure in common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 130, 207 221. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.023>

Schmidt-Nielsen, K., Taylor, C. R., Shkolnik, A., 1971. Desert Snails : Problems of Heat, *Water Food. J. Exp. Biol.* 385–398.

Schöne, B. R., Krause, R. A. 2016. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. *Global and Planetary Change*, 144, 228-251.
<https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.08.002>

Sinaei, M., 2013. Effect of 16 pure hydrocarbons on the stabilization and lysis of fish (mudskipper: *Boleophthalmus dussumieri*) erythrocytes. *Ecotox. Environ. Safe.* 98,257–265.
<http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.018>

Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y. 2008. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicol Environ Saf.* 71, 446–453. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.016>

Thebault, H; Baena, A. M.R. 2007. Mediterranean Mussel Watch: a Regional Program for Detecting Radionuclides, Trace- and Emerging-Contaminants. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*,38, 41.

Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., Silva, M.D., Randi, M. a F., Freire, C. a., Silva de Assis, H.C., Oliveira Ribeiro, C. a., 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environ. Res.* 105, 350–363.
<http://doi.org/10.1016/j.envres.2007.06.003>

Westfall, P.H., Randall, T.D., Dror, R., Wolfinger, R.D., Hochberg, Y., 1999. Multiple Comparisons and Multiple Test Using SAS®. Sas Institute Inc., Cary, USA (644 p).

Xie, J., Zhao, C., Han, Q., Zhou, H., Li, Q., Diao, X., 2017. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. *Fish. Shellfish. Immun.* 63,237-244. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.032>

Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., Miao, J., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 170, 50–59.
<http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.02.003>

Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., 2016. Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44, 75–83. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2016.04.001>

Zacchi, F.L., Lima, D., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Gomes, C.H.A., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bainy, A.C.D. 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. *Aquat Toxicol.* 183,94-103. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.016>.

Zacchi, F.L., dos Reis, I.M.M., Siebert, M.N., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Piazza, C.E., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Bainy., A.C.D. 2019. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - Part I. *Aquat. Toxicol.* 216, 105318. doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105318.

CAPÍTULO 4

4. ARTIGO 3: A INFLUÊNCIA DO GÊNERO SOBRE BIOMARCADORES MOLECULARES E HISTOLÓGICOS DE OSTRAS *CRASSOSTREA GASAR* MADURAS APÓS EXPOSIÇÃO A PIRENO.

*Isis Mayna Martins dos Reis*¹; *Jacó Joaquim Mattos*²; *Marília Nardelli Siebert*¹; *Flávia Lucena Zacchi*¹; *Camila Lisarb Velasquez Bastolla*¹; *Márcia Caruso Bicego*⁴; *Satie Taniguchi*⁴; *Carlos Henrique Araújo de Miranda Gomes*⁵; *Claudio Manoel Rodrigues de Melo*⁵; *Afonso Celso Dias Bainy*¹

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

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

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

⁴Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

*Este capítulo será submetido à revista **Aquatic Toxicology**.

4.1 RESUMO

Bivalves marinhos, como por exemplo as ostras, são constantemente utilizados como sentinelas da contaminação ambiental devido ao seu hábito sésil e filtrador. Devido a essas características esses animais acabam bioconcentrando em seus tecidos contaminantes orgânicos como o pireno (PIR). O PIR pode causar efeitos moleculares, histológicos, imunotóxicos e ainda comprometer a reprodução e induzir mudanças comportamentais em ostras expostas a esse composto. Considerando que características tais como o gênero, ou estágio reprodutivo tem apresentado um papel importante na resposta de animais expostos a compostos tóxicos, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas moleculares e histológicas em fêmeas e machos da ostra *Crassostrea gasar* em estágio de pré-desova expostas a PIR (0,25 e 0,5 μ M) por 24 h. As concentrações de PIR foram quantificadas na água e nos tecidos de fêmeas e machos. Níveis de transcritos de genes de biotransformação (*CYP3475C*, *CYP2-like*, *CYP2AUI*, *CYP356A*, *GSTO-like*, *GSTM-like*, *SULT-like*), mecanismos de estresse (*HSP70*), e ligados à reprodução (*Vitelogenina*, *Glicoproteína*) foram avaliados na brânquia. Além disso, alterações histológicas e localização de mRNA *CYP2AUI* em brânquias, manto e divertículos digestivos foram avaliados. Fêmeas e machos em estágio de pré-desova bioconcentraram PIR em seus tecidos. Machos apresentaram maior sensibilidade a exposição a PIR. Níveis de transcritos de *CYP2AUI* foram induzidos em machos ($p < 0,05$), assim como a atrofia tubular foi observada apenas em machos expostos a PIR ($p < 0,05$). Níveis de transcritos do gene da *Vitelogenina* foram menores em machos ($p < 0,05$). Diante desses resultados, sugere-se o gene *CYP2AUI* como potencial biomarcador de contaminação por pireno em ostras *C. gasar* e que o fator sexo e o estágio reprodutivo como possíveis interferentes nas respostas de biomarcadores.

Palavras-chave: estágio reprodutivo, identificação sexual, *citocromo P450*, bivalve, HPA.

4.2 ABSTRACT

Marine bivalves, such as oysters, are constantly used as sentinels for evaluating of environmental contamination due to their sessile and filtering habits. As a consequence of these characteristics, these animals bioconcentrate organic contaminants such as pyrene (PYR) in their tissues. PYR can cause molecular, histological, immunotoxic effects and also compromise reproduction and induce behavioral changes in oysters exposed to this compound. Considering that characteristics such as gender, or reproductive stage have played an important role in the response of animals exposed to toxic compounds, the objective of this study was to evaluate the molecular and histological responses in females and males of oyster *Crassostrea gasar* in pre-spawning stage exposed to PYR (0.25 and 0.5 μ M) for 24 h. PYR concentrations were quantified in water and in female and male tissues. Transcripts of genes related to biotransformation (*CYP3475C*, *CYP2-like*, *CYP2AUI*, *CYP356A*, *GSTO-like*, *GSTM-like*, *SULT-like*), stress mechanisms (*HSP70*), and reproduction (*Vitelogenin*, *Glicoprotein*) were evaluated in gills. In addition, histological changes and localization of *CYP2AUI* mRNA transcripts in gills, mantle and digestive diverticulum were evaluated. Females and males in pre-spawning stage bioconcentrated PYR in their tissues. Males were more sensitive to exposure to PYR. *CYP2AUI* transcripts were induced in males ($p < 0.05$), as well as tubular atrophy was observed only in males exposed to PYR ($p < 0.05$). *Vitelogenin* transcripts were lower in males ($p < 0.05$). Given these results, the *CYP2AUI* gene is suggested as a potential biomarker of PYR exposure in oyster *C. gasar* and further point out reproductive status and gender must be considered in the interpretation of biomarker responses.

Key-words: reproductive stage, sexual identification, *cytochrome P450*, bivalve, PAH.

4.3 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são contaminantes orgânicos ubíquos detectados na coluna d'água, sendo ainda, frequentemente associados à matéria particulada ou aos tecidos de organismos marinhos, como os de moluscos bivalves (Zhou et al., 1998; Ertl et al., 2016). A exposição aos HPA, e a resultante bioconcentração nos tecidos em bivalves, pode causar uma série de efeitos fisiológicos nesses animais (Ertl et al., 2016).

Devido principalmente a seu hábito sésil e filtrador, os bivalves marinhos são constantemente utilizados como organismos sentinela de contaminação ambiental (Xie et al., 2017; Ertl et al., 2016). Além disso, características fisiológicas como possuir uma circulação aberta, faz com que a hemolinfa seja um meio de transferência de metabólitos, facilitando a circulação de HPA por todo o organismo (Xie et al., 2017; Gosling, 2003). Tecidos como as brânquias e o divertículo digestivo são considerados como as principais vias de captação de HPA, devido ao seu contato direto e a rápida assimilação desses compostos na água (Arienzo et al., 2019).

Dentre os principais HPA, o pireno (PIR) é comumente encontrado no ambiente marinho e se origina principalmente da combustão incompleta de combustíveis fósseis e do uso de compostos de petróleo (Xie et al., 2017). Este composto possui quatro anéis aromáticos fusionados e um alto potencial carcinogênico (Kennish, 1992). Ademais, o PIR pode causar distúrbios imunológicos, estresse oxidativo, imunotoxicidade, dano ao DNA, reduzir significativamente a reprodução e induzir mudanças comportamentais em animais aquáticos (Ito et al., 1978; Lotufo et al., 1996; Oliveira et al., 2012; Xie et al., 2017). Além disso, estudos demonstram alterações em tecidos específicos. Efeitos moleculares, histológicos e imunotóxicos foram observados no manto, divertículo digestivo, brânquias e hemolinfa de ostras expostas a este HPA (Zacchi et al., 2019; Xie et al., 2017).

Pesquisas que avaliam o comportamento alimentar, estado de saúde, sexo e etapas do ciclo reprodutivo de bivalves relacionados com o padrão de acumulação de HPAs são relativamente escassas (Xie et al., 2017; Xiu et al., 2016; 2015; González-Fernández et al., 2016). A interferência desses fatores biológicos, quando não analisados, podem gerar incertezas nos resultados obtidos em estudos de biomonitoramento ambiental (Martín-Díaz et al., 2004). Considerando que a reprodução é um dos processos fisiológicos mais importantes no ciclo de vida de bivalves (Enríque-Díaz et al., 2009), o conhecimento do sexo e do período reprodutivo pode ser determinante para o biomonitoramento.

Avaliações de riscos químicos e toxicológicos demonstram que características tais como o sexo e período reprodutivo têm um papel importante na resposta de animais expostos a compostos tóxicos (Hines et al., 2007; Xiu et al., 2015). Durante o período de pós-desova foi observada uma diminuição dos níveis de transcritos de *Citocromo P450* e atividade EROD em fêmeas de bivalves expostos a HPA (Xiu et al., 2015). Adicionalmente, foi observada a indução de transcritos de GST em machos (pré-desova) com o passar do tempo de exposição e aumento da concentração de HPA (Xiu et al., 2015).

A influência de fatores abióticos (temperatura, salinidade, pH) na transcrição de genes de biotransformação de ostras expostas a diferentes HPA e o potencial uso do gene *CYP2AUI* como biomarcador molecular de exposição a esses compostos já foram evidenciados em estudos anteriores de nosso grupo (dos Reis, 2015; Lima et al., 2019, 2018; Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2017, 2019). Entretanto, até o momento, inexistem estudos que avaliem efeitos de parâmetros bióticos associados à exposição a HPA em ostras *Crassostrea gasar*.

Considerando que características tais como o gênero, ou estágio reprodutivo têm apresentado um papel importante na resposta de animais expostos a compostos tóxicos (Hines et al., 2007; Xiu et al., 2015), são necessários estudos que avaliem os efeitos desses parâmetros sobre as respostas da ostras *C. gasar* sob condições de exposição a HPA.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do gênero sobre as respostas dos biomarcadores associados à exposição a PIR nas respostas moleculares e histológicas na ostra *C. gasar*. Fêmeas e machos da ostra *C. gasar* em estágio pré-desova foram previamente identificados quanto ao sexo e expostas a duas concentrações de PIR em condições de laboratório. Este foi o primeiro estudo a elucidar a influência do gênero e *status* reprodutivo sobre a resposta de alguns biomarcadores desta espécie após exposição a algum HPA e fornece informações úteis sobre biomarcadores histológicos e moleculares relacionado à sua exposição a PIR.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Coleta, aclimatação e anestesia das ostras *C. gasar*

Ostras do mangue *Crassostrea gasar* de $8,1 \pm 0,7$ cm (fêmeas) e $7,9 \pm 0,7$ cm (machos) de altura (Galtsoff, 1964), de mesmo lote, condições de manejo e estágio reprodutivo de pré-desova foram adquiridas em novembro (final da primavera) de um cultivo

comercial localizado no Ribeirão da Ilha, em Florianópolis, Santa Catarina, Sul do Brasil, e transportadas até o Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM/UFSC). As ostras foram colocadas em tanques de condicionamento (500 L) e mantidas em sistema de fluxo contínuo de água, em constante aeração, temperatura (23°C) e salinidade (36), até os experimentos subsequentes de anestesia. Durante o período de manutenção, os animais foram mantidos com alimentação natural em sistema contínuo com mistura de microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* (concentração final de: 8×10^4 cel.mL⁻¹ e 8×10^4 cel.mL⁻¹ respectivamente), diferentemente dos experimentos anteriores com alimentação comercial.

Um total de 100 ostras foram retiradas por dia de modo aleatório dos tanques de 500L e anestesiadas em calhas (500 L) com volume útil de 100 L, contendo uma solução com concentração final de 50 g.L⁻¹ (525 mM) de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) e água, conforme os procedimentos descritos em Puchnick-Legat et al. (2015). Para evitar o aumento da salinidade pela adição de MgCl₂, o meio de diluição foi ajustado com água destilada até que atingisse a salinidade adequada (36). Um grupo controle de 10 animais foi colocado em um recipiente de 100 L contendo água marinha sem MgCl₂, nas mesmas condições do dia anterior. Durante o processo anestésico a aeração foi interrompida. Os animais foram considerados anestesiados quando permaneceram com as suas valvas abertas após sucessivas pressões exercidas na concha. Nas ostras anestesiadas foi realizada uma amostragem do tecido gonádico ao lado do músculo adutor posterior, usando uma pipeta Pasteur para cada indivíduo seguindo a metodologia adotada por Puchnick-Legat e colaboradores (2015) com algumas modificações. Cada amostra de tecido (aproximadamente 0,05 mL) foi puxada com a pipeta e colocada em uma lâmina de vidro e o sexo foi determinado usando um microscópio óptico binocular com amplificação de 40x e 100x. Posteriormente, as ostras sexualmente identificadas foram separadas por sexo (fêmeas, machos e indeterminadas) e colocadas em tanques para recuperação.

A recuperação da anestesia foi monitorada a cada 1 h, as ostras foram mantidas em calhas com sistema contínuo contendo água marinha filtrada e esterilizada, com aeração, temperatura (22°C) e salinidade (36) e alimentação com microalgas. As ostras foram consideradas recuperadas quando retomaram a habilidade de fechar as valvas imediatamente após o seu manuseio. Após a recuperação, os grupos controles e os grupos de animais anestesiados (machos e fêmeas) foram identificados e dispostos nos tanques de condicionamento para o registro da sobrevivência durante 10 dias. O procedimento anestésico

se repetiu até ser atingindo o número esperado de 51 machos e 51 fêmeas, sendo que um total de 200 ostras foram anestesiadas.

Para a exposição a Pireno, 90 ostras (45 fêmeas e 45 machos) foram transferidas até o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação e Imunoquímica Aquática da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/ UFSC) e foram aclimatadas por 24h em tanque de 20L, em sistema de recirculação contínua e mantidas sob condições controladas em água com salinidade (36), temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 0,9^{\circ}\text{C}$), pH ($7,6 \pm 0,1$), amônia ($<0,25$) e fotoperíodo (12h:12h). Durante o período de aclimação as ostras não foram alimentadas.

4.4.2 Exposição a Pireno

Ao final do período de aclimação, as ostras foram alimentadas por 2h com alimentação natural (mistura de microalgas *Isochrysis galbana* 8×10^4 cel.mL⁻¹, e *Chaetoceros muelleri*, 8×10^4 cel.mL⁻¹) e posteriormente, transferidas para 18 tanques contendo 15L de água cada (cinco animais por tanque) para a exposição de pireno. Pireno (98% de pureza, Sigma-Aldrich) (PIR) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado aos tanques de exposição até alcançar as concentrações nominais de pireno. Ostras foram expostas em triplicata desta maneira: Para 24h de exposição – três tanques controle, três tanques contendo pireno a $0,25 \mu\text{M}$ (P1) e três tanques contendo pireno a $0,5 \mu\text{M}$ (P2); para 96h de exposição – três tanques controle, três tanques contendo pireno a $0,25 \mu\text{M}$ (P1) e três tanques contendo pireno a $0,5 \mu\text{M}$ (P2). No grupo controle, 0,002% (concentração final) de DMSO foi adicionado.

Após os períodos de exposição, três ostras de cada tanque (n=9) foram dissecadas e as brânquias foram removidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para a realização das análises moleculares, foram realizados os cortes histológicos transversais (abrangendo a região da brânquia, manto, gônada e divertículo digestivo) e os tecidos remanescentes juntamente com duas ostras de cada tanque (n=6) foram dissecados e destinados à quantificação química do PIR. Ao final do período de aclimação (tempo zero), também foi realizado um *pool* com uma ostra de cada tanque (n=3 por grupo) para a quantificação do PIR.

Nenhuma mortalidade foi observada nos grupos controle e expostos durante o experimento. As concentrações de PIR foram escolhidas baseadas na possibilidade de risco ou perigo aos animais e seres humanos em ambientes aquáticos de acordo com a lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States

Environmental Protection Agency - US EPA). Os tanques com aeração individual foram cobertos com tampa de vidro. Cada grupo de tanques (controle ou expostos) foram mantidos dentro de caixas de madeira hermeticamente fechadas contendo filtros de vapores orgânicos, para evitar potenciais contaminações dos grupos controle e expostos.

4.4.3 Concentração de PIR na água dos tanques

A concentração de PIR na água de cada grupo controle ou exposto foi monitorada por fluorimetria nas primeiras 24 h de exposição. Paralelamente, a depleção de PIR foi quantificada em um tanque para cada grupo exposto, mas sem ostras. O monitoramento da fluorescência de PIR foi realizado no comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão de 382 nm. As análises foram realizadas usando espectrofluorímetro (Spectramax M5) no módulo de leitura de cubetas, imediatamente após a coleta de 1 mL de água de cada tanque. Uma curva de referência padrão foi realizada a partir de 2 mg. L⁻¹ da solução de PIR após uma diluição em série para obter a concentração desejada. As amostras foram coletadas a cada 15 minutos durante a primeira hora de exposição; a cada 30 minutos durante 2 horas subsequentes; a cada hora durante as 8 horas subsequentes e após 24 horas de exposição. A meia-vida de PIR nos tanques foi calculada com base na equação de regressão exponencial.

4.4.4 Concentração de PIR nos tecidos moles de fêmeas e machos de *C. gasar*

A quantificação de PIR foi realizada em pools de tecidos moles de fêmeas e machos de *C. gasar* de cada tratamento após 24 h. As amostras foram liofilizadas e 1 g de ostras liofilizadas (Thermo Savant, liofilizador modulyoD, Waltham, MA, EUA) foram extraídas em um extrator Soxhlet com n-hexano e diclorometano a 50% (v / v), de acordo com MacLeod et al. (1985), com pequenas modificações. Essa análise foi realizada pelo Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Marcia Caruso Bicego. O protocolo para quantificação de PIR seguiu a mesma metodologia descrita no capítulo 2 e 3.

4.4.5 Procedimentos histológicos

Cortes da seção transversal dos tecidos de ostras foram realizados (Howard et al., 2004) e fixados em formalina tamponada a 4% (0,1 M, pH 7,3) durante 48 h. Após a fixação,

as ostras foram processadas de acordo com um procedimento de rotina de desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina líquida livres de RNases e de DNases (60°C). Cortes de 5µm de espessura foram realizados em micrótomo e montados em lâminas de vidro silanizadas (Sigma-Aldrich, Steinheim). Os protocolos de coloração de rotina e histoquímica, assim como as metodologias para detecção de alterações histopatológicas seguiram o mesmo processo descrito no capítulo 2.

4.4.6 Extração de RNA total e síntese de cDNA por transcrição reversa

A extração de RNA total e a síntese de cDNA foram realizados como descritos no capítulo 2. A extração do RNA total das brânquias (n=9) foi realizada utilizando o reagente Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemanha), e a síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total com kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), ambos os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes. A concentração de RNA total e de cDNA para cada amostra foi determinada por espectrofotometria a 260 nm.

4.4.7 Reação de qPCR

As sequências nucleotídicas foram selecionadas a partir da base de dados gerada pela análise do transcriptoma de brânquias e glândulas digestivas de *C. gasar* (Lüchmann et al., 2015). Os iniciadores usados nas reações de qPCR foram desenhados com o auxílio do software Primer Quest, disponível em www.idtdna.com (IDT), seguindo os parâmetros: (a) *primer size*: mínimo (mín) 18, ótimo (opt) 24 e máximo (máx) 28; (b) *primer Tm*: 55 (mín), 60 (opt), 65 (máx); (c) *primer GC%*: 45 (mín), 50 (opt), e 55 (máx); (d) *amplicon size*: 80 (mín), 130 (opt), 200 (máx); aceitando máximo de diferença de Tm (Max Tm difference) de um grau Celsius. Os genes-alvo selecionados e seus respectivos pares de iniciadores estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Genes selecionados, sequência dos iniciadores, tamanho do amplicon e função biológica.

| Símbolo | Nome do Gene | Sequência do Primer 5' - 3' | Tamanho do Amplicon (pb) | Função biológica |
|-----------------------------|---|--|--------------------------|---|
| Genes alvo | | | | |
| <i>CYP3475C1</i> | <i>Cytochrome p450 3475C1</i> | F - CCA GTG GGA ATC ACC AGA CAA ACC AGA A R - AGG AGG AGC TTC AGG CTG ACG AA | 94 | Biotransformação de xenobióticos Fase I |
| <i>CYP2A1</i> | <i>Cytochrome p450 2A1</i> | F - AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC R - TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA | 158 | Biotransformação de xenobióticos Fase I |
| <i>CYP2-like</i> | <i>Cytochrome p450 family 2</i> | F - CGC TTC GCA GTC CAA GTT GAC AAA R - ATC GTG TTT GGG TTC AGG TAT GCG | 136 | Biotransformação de xenobióticos Fase I |
| <i>CYP356A</i> | <i>Cytochrome p450 - 356A</i> | F - TGT TCA GGC CCA ACA ACT CTG TCA R - GGG AGT GGA CTC AAC CAG ATT CAC AA | 114 | Biotransformação de xenobióticos Fase I |
| <i>GSTO-like</i> | <i>Glutathione-S-transferase omega</i> | F - ATT GGC ACA CGT ACC TCG TCT GAT R - TTA ATG GGA CCG CCA GAA GGT CAT | 175 | Biotransformação de xenobióticos Fase II |
| <i>MGST-like</i> | <i>Microsomal Glutathione-S-transferase</i> | F - GCA TTG TCT GGT GTG GTT TGG TGT R - CCT GAG AGT ATG ATG CAG CTT GCA GA | 198 | Biotransformação de xenobióticos Fase II |
| <i>SULT-like</i> | <i>Sulfotransferase 1C4</i> | F - CAC CTG TTA CCT CGC CAT ACT CCA R - ACT ACC ATG TCC TTC ATC AGG TCC C | 149 | Biotransformação de xenobióticos Fase II |
| <i>HSP70</i> | <i>Heat shock protein 70</i> | F - ACA GCA GCC GCC ATT GCT TAT R - ACA TCA AAG GTT CCT CCT CCC AAG TC | 104 | Chaperona |
| <i>Glicoproteína</i> | <i>Glycoprotein-hormone receptor</i> | F - TAG GCG GGT CCT ACG ACG AGA T R - TCG TCA TGA TGC TGA TGT TCG TCA TCA AA | 103 | Maturação |
| <i>Vitelogenina</i> | <i>Vitellogenin</i> | F - TGA ATA TGA AAC GCA GGC ATT GAC TGG A R - CGG AAG ATC GGG ATC GAA ACT GGA TT | 107 | Expressão sexual |
| Genes Normalizadores | | | | |
| <i>EF-like</i> | <i>Fator de alongação 1-alfa</i> | F - ATT GAC CAG AGA ACC ATC GCC AAG T R - ACG CTC AGC CTT GAG TTT GTC CAA TA | 102 | Síntese proteica |
| <i>28S-like</i> | <i>Ribosomal Subunit 28</i> | F - CCC GAA GCC AAA CAC ATT CAA GTG G R - GGC TTT CCA TTG CGG TCA CCT TAG | 131 | Proteína de RNA ribossomal |

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Os níveis de transcritos dos genes alvo foram analisados nas brânquias das ostras, por qPCR, em termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e analisados no programa Rotor Gene 6000 Series Software. A eficiência das reações de qPCR foi determinada para cada par de iniciadores por uma curva padrão de cDNA preparada a partir de um *pool* de amostras, que incluiu amostras de todos os grupos de exposição, preparada a partir de uma diluição seriada nas seguintes quantidades de cDNA: 25, 50, 100, 200 e 400 ng/reacção. Para as análises, foram utilizados os genes em que as curvas apresentaram um R^2 maior ou igual a 0,99 e eficiência entre 98% e 100%. Para testar e escolher os genes de referência foi utilizado o método 2^{-Cq} (Schmittgen e Livak, 2008). Para a

normalização dos dados, foram utilizados os genes de referência *Fator de alongação-like 1 alfa (EF-like)* e *Ribossomal 28S-like (28S-like)*. A média geométrica dos valores de Ct destes dois genes foi calculada, para fêmeas e machos expostos a PIR por 24h. Para os genes de interesse, foi aplicado o método $2^{-\Delta Cq}$ (Schmittgen e Livak, 2008). Todos os dados foram normalizados pelos respectivos grupos controle.

4.4.8 Clonagem e sequenciamento do gene CYP450 2AU1 (*CYP2AU1*)

Para a análise de hibridização *in situ* para fêmeas e machos expostas a PIR por 24h, o gene CYP450 2AU1 (*CYP2AU1*) foi escolhido, uma vez que no capítulo 2 foi observado intenso sinal desse gene em diversos tecidos da ostra *C. gasar* exposta a PIR (Zacchi et al., 2019). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit Omniscript™ Reverse Transcriptase (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Procedimentos de clonagem e síntese dos iniciadores para a reação de PCR estão descritos no Capítulo 2.

4.4.9 Sonda de RNA

O DNA plasmidial foi linearizado com as enzimas BamHI e EcoRV (Promega, Madison) próximo aos promotores do plasmídeo SP6 e T7, seguindo as instruções do fabricante. As sondas de RNA (ribosondas) foram transcritas *in vitro* e marcadas com digoxigenina (DIG) com base no procedimento de Barroso-Chinea et al. (2007) e estão descritas detalhadamente no capítulo 2.

4.4.10 Hibridização *in situ* (ISH)

A reação de hibridização *in situ* para fêmeas e machos expostas a PIR por 24h e grupos controle, foi realizada conforme descrito em Dos Reis et al. (2015). A hibridização com as ribosondas sense foram utilizadas como controle negativo. Os resultados da presença da isoforma *CYP2AU1* nos diferentes tecidos de fêmeas e machos, foram semi-quantificadas de acordo com o método de avaliação de ISH proposto por Henke et al. (2006), onde o grau da coloração foi classificado como de baixa (+), média (++) e alta (+++) intensidade.

4.4.11 Estatística dos dados

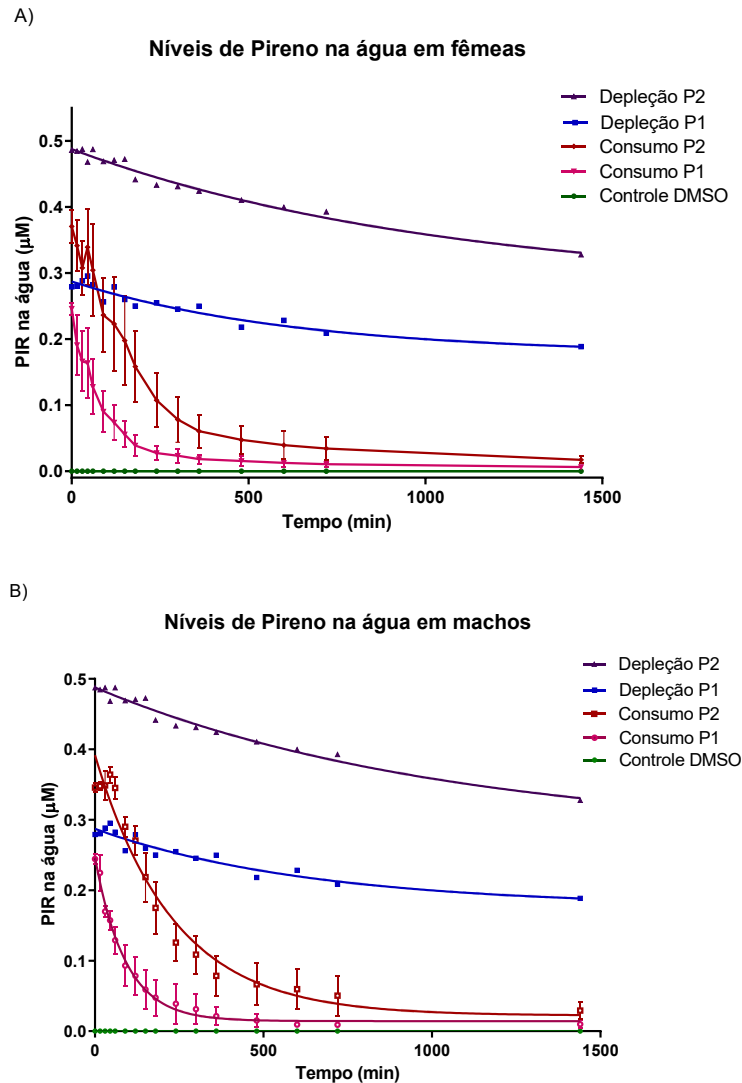
Neste estudo, um desenho estatístico hierárquico foi utilizado para análise molecular e histológica. Nos dados, foi aplicado teste-*t* não paramétrico com permutação pelo procedimento multitestes com correção de Bonferroni Westfall et al. (1999). Para todas as análises, não foram observados efeitos dos tanques. As diferenças significativas entre os grupos foram definidas como $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism® 8 e SAS®.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Concentração de PIR na água dos tanques

Após 24 h de exposição, os níveis de PIR na água contendo fêmeas diminuíram 97,5% de $0,25 \pm 0,006 \mu\text{M}$ para $0,006 \pm 0,001 \mu\text{M}$ no grupo P1 e da mesma forma no grupo P2 (97,3%) de $0,37 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para $0,01 \pm 0,004 \mu\text{M}$ (Fig. 12A). Os níveis de PIR na água contendo machos diminuíram 96,25% de $0,24 \pm 0,004 \mu\text{M}$ para $0,009 \pm 0,004 \mu\text{M}$ no grupo P1 e da mesma forma no grupo P2 (91,2%) de $0,34 \pm 0,005 \mu\text{M}$ para $0,03 \pm 0,009 \mu\text{M}$ (Fig. 12B). No tanque sem ostras, os níveis de PIR na água diminuíram de $0,28 \mu\text{M}$ para $0,19 \mu\text{M}$ (32%) no grupo P1 e uma diminuição semelhante (32,2%) ocorreu no grupo P2 (de $0,48 \mu\text{M}$ para $0,33 \mu\text{M}$) (Fig.12). A meia-vida do PIR no tanque com fêmeas foi de 2h 51 min (P1) e 2h 32 min (P2) e no tanque com machos foi de 2h 45 min (P1) e 2h 44 min (P2).

Figura 12: Concentração de pireno (PIR) medido por fluorescência na água dos tanques com (Consumo) ostras ou sem (Depleção) de fêmeas (A) e machos (B) de *Crassostrea gasar*, durante 24 h de exposição: (A) Experimento de exposição ao PIR 0,25 μM (P1) e PIR 0,5 μM (P2) na água com fêmeas e Controle com DMSO, sem ostras; (B) Experimento de exposição ao PIR 0,25 μM (P1) e PIR 0,5 μM (P2) na água com fêmeas e Controle com DMSO, sem ostras.

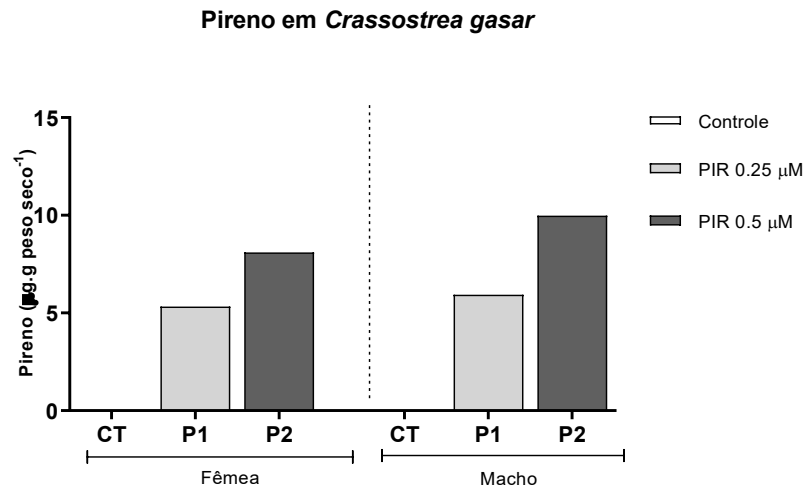


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

4.5.2 Concentração de PIR nos tecidos de fêmeas e machos de *C. gasar*

Nos grupos expostos, após 24 h, os níveis de PIR nos tecidos moles de fêmeas foram 5,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P1) e 8,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P2), respectivamente. Os níveis de PIR nos tecidos moles de machos foram de 5,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P1) e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco (P2), respectivamente (Fig. 13A). A concentração de PIR nos tecidos moles de fêmeas e machos do grupo controle e tempo zero (T0) foi inferior a 0,5 $\mu\text{g} / \text{g}$ de tecido seco em todos os tratamentos.

Figura 13: Concentração de pireno ($\mu\text{g}\cdot\text{g peso seco}^{-1}$) em tecidos moles de fêmeas e machos de *Crassostrea gasar* em tempo zero após 24 horas de exposição: controle (CT); PIR 0,25 μM (P1) e PIR 0,5 μM (P2).



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

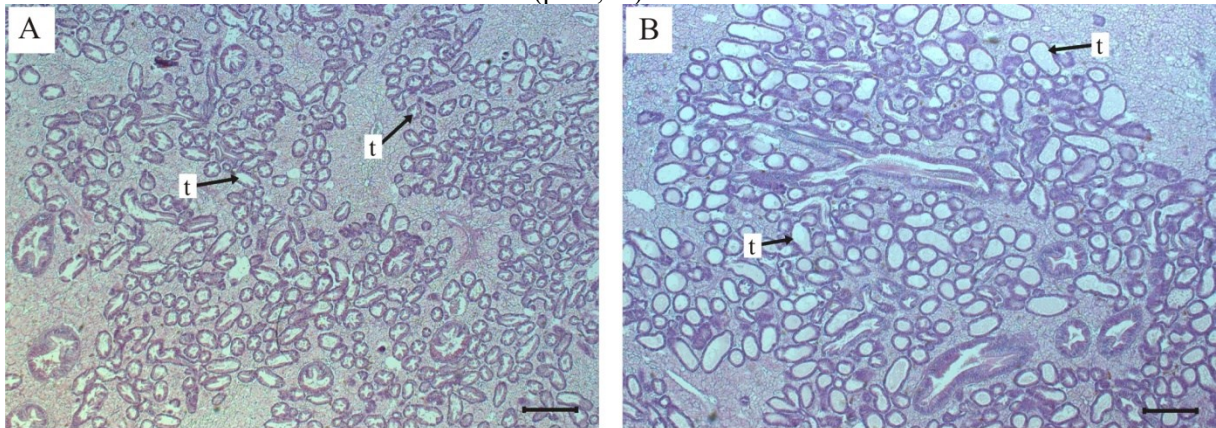
4.5.3 Histologia

A análise por microscopia de luz revelou alterações na estrutura do tecido dos divertículos digestivos de ostras expostas a PIR em relação aos respectivos grupos controle. Após 24 h de exposição a PIR, divertículos digestivos de machos de *C. gasar* apresentaram um aumento significativo no nível de atrofia tubular em P2 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 14). Nos divertículos digestivos das fêmeas expostas a PIR, não foram verificadas diferenças significativas na atrofia tubular ($p > 0,05$). Hipertrofia, hiperplasia, células marrons ou parasitas não foram observadas nos divertículos digestivos das ostras.

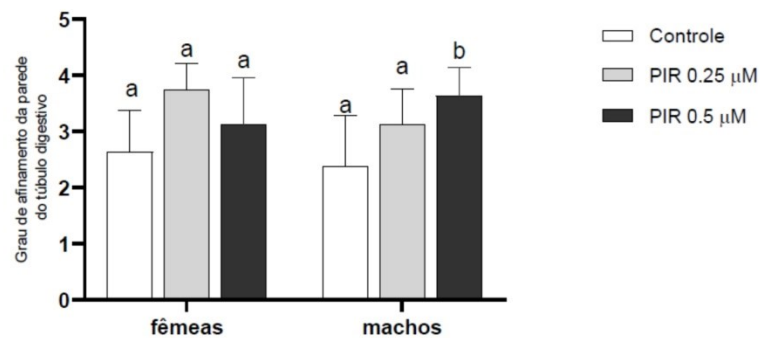
No manto de fêmeas e machos expostos a PIR foi observada a presença de células mucosas (Fig. 15), entretanto quando comparados aos respectivos grupos controle, diferenças significativas na porcentagem de células mucosas não foram observadas ($p > 0,05$).

Neste estudo, o sexo das ostras foi previamente identificado através de procedimentos anestésicos, sendo possível obter o mesmo número de machos e fêmeas para cada grupo experimental antes da exposição a PIR. Nenhuma mortalidade foi observada antes e depois do processo de anestesia. Através de exame histológico da gônada foi possível confirmar o sexo dos indivíduos e determinar que ostras (fêmeas e machos) se encontravam em estágio reprodutivo de repleção/pré-desova (Fig. 16). Nenhuma anormalidade da gônada como: atrofia, hipertrofia ou degeneração do epitélio germinativo, redução de células de armazenamento, atresia no oócito ou espermátide foi observada nas ostras.

Figura 14: Atrofia dos túbulos digestivos de fêmeas e machos de *C. gasar* expostas a PIR por 24h e grupos controle: (A) Túbulos digestivos (t) de fêmeas com grau moderado de atrofia; (B) Túbulos digestivos de machos com forte grau de atrofia, parede extremamente fina. Barras: 100 μ m; Coloração: HHE; Análise semi-quantitativa da atrofia tubular nos divertículos digestivos de fêmeas e machos de *C. gasar* expostas a P2 por 24h. O grau de atrofia foi classificado de acordo com dos Reis et al. (2015) e Ellis et al. (1998) como 0–1 (túbulo normal), 1–2 (presença baixa), 2–3 (presença moderada), 3–4 (presença forte). Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

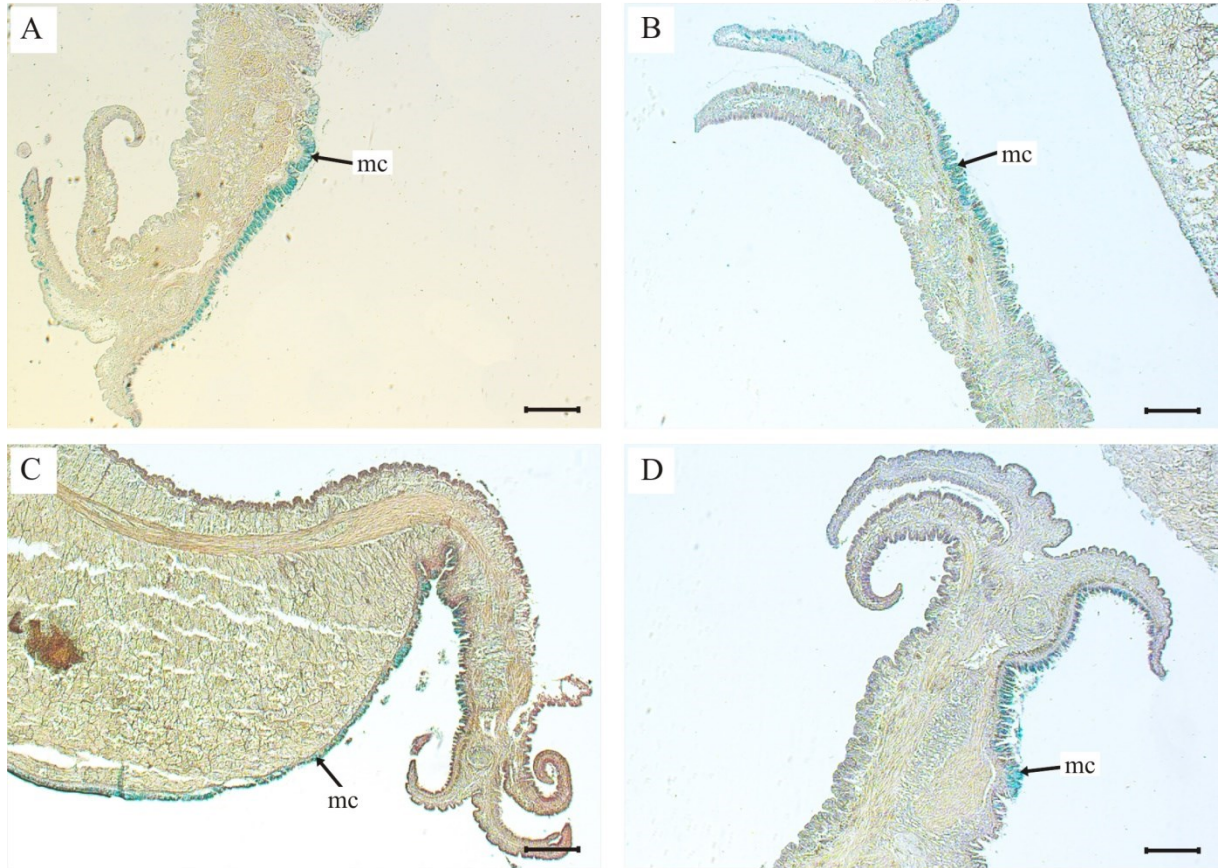


C Atrofia do túbulo digestivo em *C. gasar*

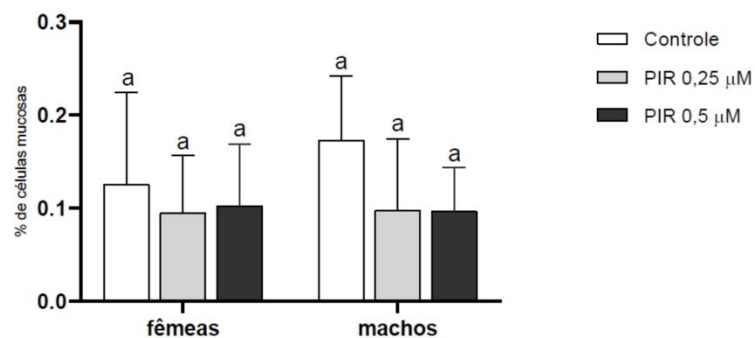


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Figura 15: Células mucosas no manto de fêmeas e machos *C. gasar* expostas a duas concentrações de PIR por 24 h e grupos controle: (A) Presença de células mucosas (MC) na borda do manto de fêmea (grupo controle, PIR, 24h), destacado em azul; (B) detalhe (azul) na borda do manto de macho (grupo controle PIR, 24h); (C) detalhe (azul) na borda do manto de fêmea (grupo P1, 24h) e (D) detalhe (azul) na borda do manto de macho exposto a P1, 24h. Barras: 100 μ m; Coloração: Alcian Blue; Porcentagem de células mucosas na borda do manto de fêmeas e machos *C. gasar* expostas a PIR por

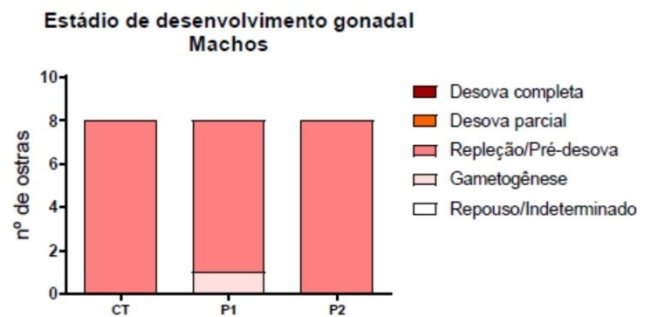
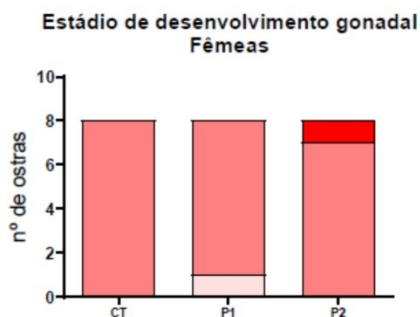
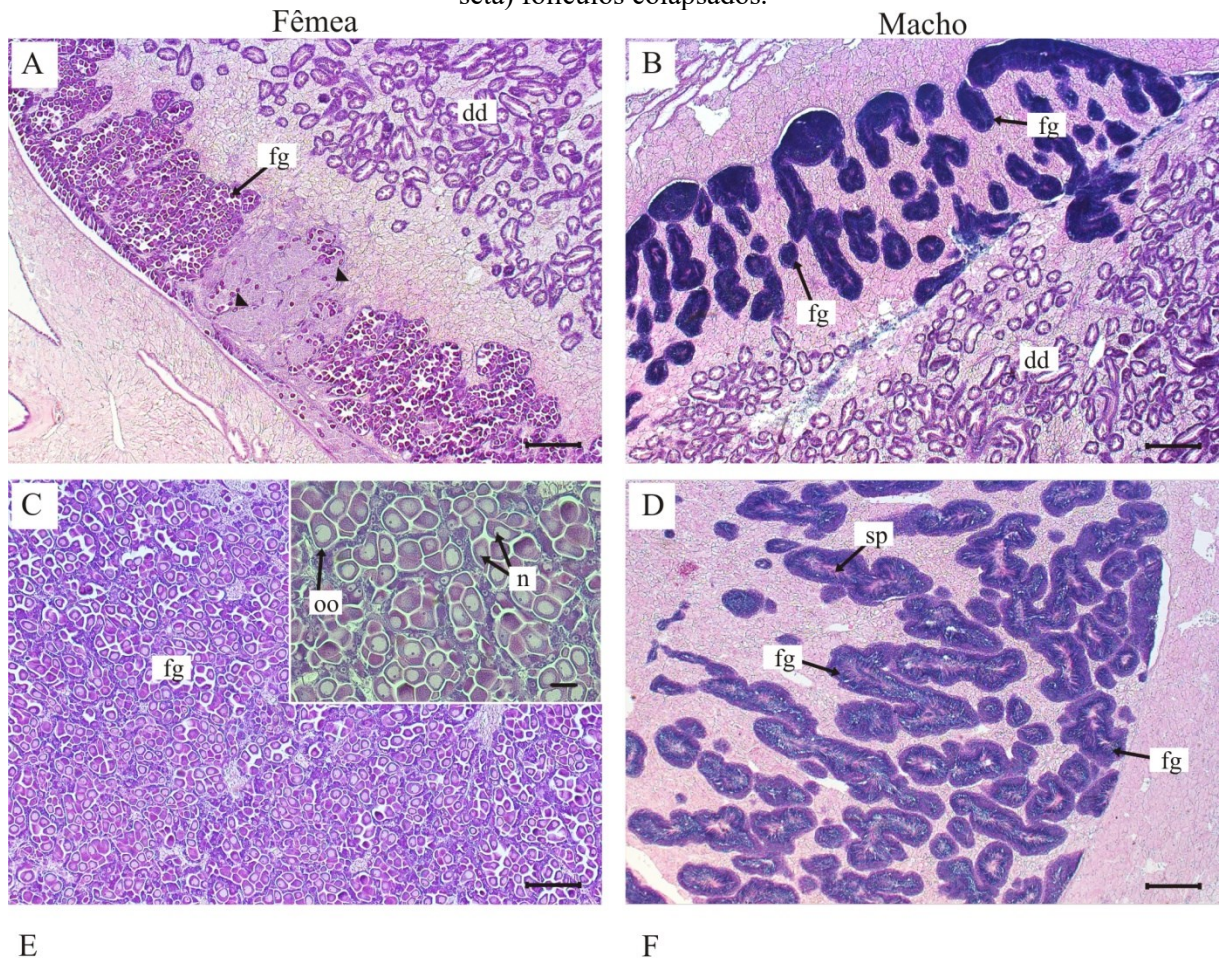


E Células mucosas no manto de *C. gasar*



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Figura 16: Estádios de desenvolvimento gonadal de fêmeas e machos de *C. gasar* expostos por 24 h a PIR: controle (CT), PIR 0,25 μ M (P1), e PIR 0,5 μ M (P2). (A) Estádio de desova parcial na gônada de fêmeas expostas a P1; (B) Estádio de gametogênese na gônada de machos expostos a P1; (C) Estádio de pré-desova de fêmeas, detalhe das células foliculares contendo oócitos predominantemente livres (oo) com distintos núcleos e nucléolos (n) (P2, 24 h); (D) estágio de pré-desova de gônadas de machos com folículos (fg) preenchidos com espermatozóides (sp) (P2, 24 h); (E) Gráfico dos diferentes estádios de desenvolvimento gonadal (repouso / indeterminado, gametogênese, repleção / pré-desova, desova parcial e completa) de fêmeas e machos de *C. gasar* expostos a PIR por 24 h e grupos controle. Barras: 100 μ m (A-D), 20 μ m (Cc); Coloração: HHE; (dd) divertículo digestivo; (ponta de seta) folículos colapsados.



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

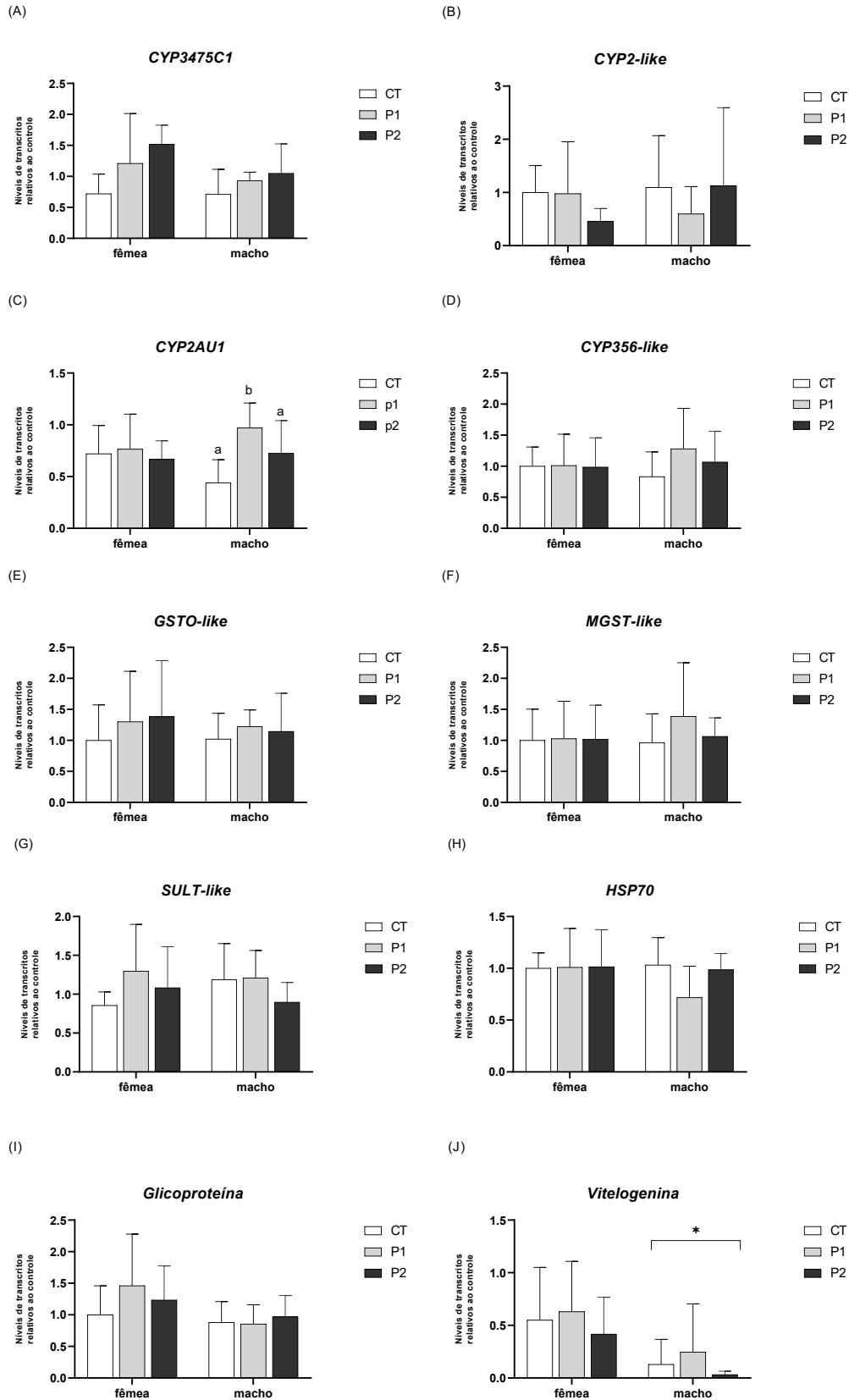
4.5.4 Níveis de transcritos de genes

Os níveis de transcritos de oito genes envolvidos no sistema de biotransformação (*CYP3475C*, *CYP2-like*, *CYP2AUI*, *CYP356A*, *GSTO-like*, *GSTM-like*, *SULT-like*), mecanismos de estresse *HSP70*, e dois genes ligados a reprodução (*Vitelogenina*, *Glycoprotein-hormone receptor*) foram analisados nas brânquias de machos e fêmeas expostas a PIR por 24h.

Em machos de *C. gasar* expostos ao PIR, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de transcritos do gene *Citocromo P450 2AUI* (*CYP2AUI*), 0,97 vezes maiores no grupo P1, quando comparados ao grupo controle (Figura 17C).

Quando comparado os sexos, apenas o gene da *Vitelogenina* apresentou diferença. Fêmeas da ostra *C. gasar* apresentaram um maior nível de transcritos quando comparado a machos ($p < 0,05$) (Figura 17J).

Figura 17: Nível de transcritos dos genes: (A) *CYP3475C*, (B) *CYP2-like*, (C) *CYP2AU1*, (D) *CYP356A*, (E) *GSTO-like*, (F) *MGST-like*, (G) *SULT-like*, (H) *HSP70*, (I) *Glicoproteína*, (J) *Vitelogenina* em brânquias de fêmeas e machos de ostras *C. gasar* de expostos a 24 h a PIR: controle (CT); PIR 0,25 μ M (P1) e PIR 0,5 μ M (P2). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Valores indicados como média \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferenças entre os sexos ($p < 0,05$).

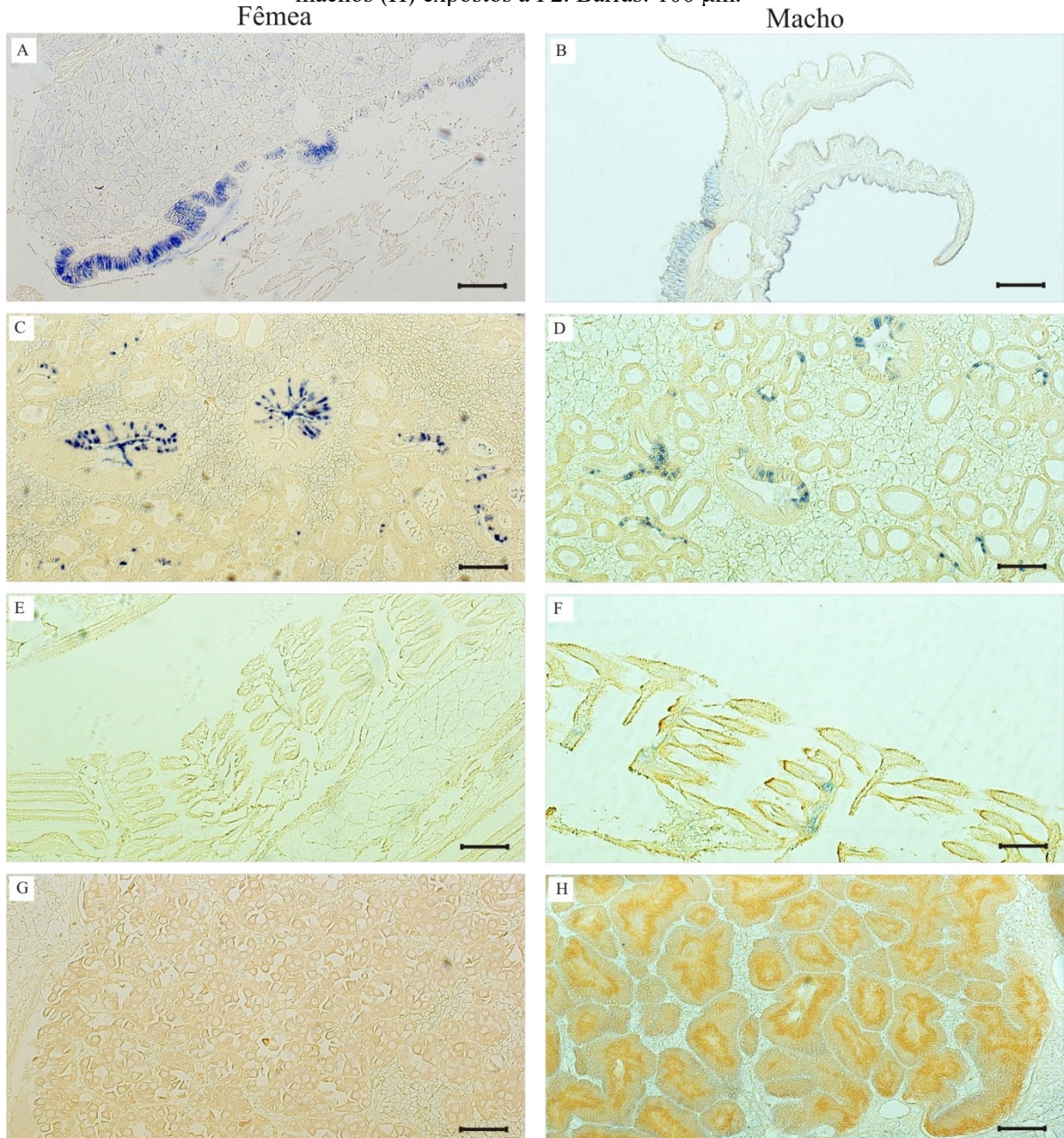


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

4.5.5 Localização dos mRNAs do *CYP2AUI*

Lâminas contendo a sonda de mRNA complementar (antissense) revelaram a cor azul/roxa em órgãos específicos. O sinal dos transcritos do *CYP2AUI* utilizando a técnica de ISH foi detectado com um grau de intensidade moderado a forte, na borda do manto e nas células do túbulo digestivo de fêmeas e machos. Sinal de hibridização muito fraco foi observado nas células branquiais e nenhum sinal foi observado nas gônadas de fêmeas e machos da ostra *C. gasar* (Fig. 18). Diferenças significativas na intensidade do sinal não foram observadas em tecidos específicos de fêmeas e machos de ostras expostas a PIR, quando comparados aos seus respectivos controles ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Figura 18: Localização de transcritos de mRNA de *CYP2A11* por ISH no manto, divertículo digestivo, brânquias e gônadas de fêmeas e machos de ostras *C. gasar* expostas por 24 h a PIR: controle (CT); PIR 0,25 μ M (P1) e PIR 0,5 μ M (P2). Sinal positivo (azul / roxo) nas células epiteliais da borda do manto de fêmeas (A) e machos (B) expostos a P1; Sinal positivo nos túbulos do divertículo digestivo (azul / roxo) de fêmeas (C) e machos (D) expostos a P2; Sem sinal (azul / roxo) nos filamentos branquiais de fêmeas (E) e sinal fraco (azul / roxo) nos filamentos brânquias de machos (F) expostos a P2; Sem sinal (azul / roxo) nas gônadas pré-desova de fêmeas (G) e machos (H) expostos a P2. Barras: 100 μ m.



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Tabela 5: Avaliação semi-quantitativa de ISH (sonda antissense) de sinal positivo (azul/roxo), segundo Henke et al., (2006) em ostras *Crassostrea gasar* expostas a duas concentrações de PIR por 24 h e respectivos grupos controle. *Diferenças significativas em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ (ANOVA). Grau de intensidade de sinal utilizada: (-) sem reação, (+) baixo sinal, (++) moderado, (+++) forte sinal.

| Sexo | PIR (μM) | Tecidos / órgãos | | | |
|-------|--------------------------|------------------|--------------------------|-----------|--------|
| | | Manto | Divertículo digestivo | Brânquias | Gônada |
| Fêmea | Control | ++ | ++ | - | - |
| | 0.25 | ++ | ++ | - | - |
| | 0.5 | +++ | ++ | - | - |
| Macho | Control | ++ | ++ | - | - |
| | 0.25 | ++ | ++ | - | - |
| | 0.5 | +++ | ++ | + | - |

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

4.6 DISCUSSÃO

Com o aumento da contaminação em ecossistemas marinhos, os biomarcadores vêm sendo utilizados como ferramentas na avaliação dos efeitos biológicos dos contaminantes e têm sido amplamente incluídas em programas de monitoramento ambiental. Muitas vezes, nesses programas alguns parâmetros bióticos são desconsiderados como o gênero e o *status* reprodutivo dos organismos sentinelas, mascarando a resposta dos biomarcadores em organismos sentinelas, como o caso das ostras. Por isso o principal objetivo deste trabalho foi identificar os efeitos que têm o gênero e o *status* reprodutivo de pré-desova de *C. gasar* sobre os biomarcadores, após exposição a PIR.

Os níveis de PIR na água dos tanques contendo ostras (fêmeas e machos), concomitantemente com os resultados das análises químicas nos tecidos, demonstraram que houve bioconcentração de PIR pelas ostras durante as 24h de exposição. Níveis de PIR, advindos da água e concentrados nos tecidos, mostraram que tanto em fêmeas, quanto em machos, os resultados foram muito semelhantes (Fig 12 e 13). A diminuição de PIR nos tanques sem ostras (fêmeas e machos) também foi observada, indicando que há uma depleção desse composto não associada ao consumo pelas ostras. Apesar da concentração de PIR ser maior nos tecidos dos grupos expostos à maior concentração (P2), aliado ao maior consumo

na água também por ostras expostas a essa concentração (P2), fêmeas e machos apresentaram resultados aproximadamente 10 vezes menores nos tecidos, e 1,5 vezes menores no consumo na água que o estudo anterior realizado com a mesma espécie, tempo e concentração de exposição a PIR (Zacchi et al., 2019). No estudo de Zacchi et al. (2019) as ostras se encontravam em estágio reprodutivo de repouso (imaturo), de maturação gonadal, o que pode ter favorecido uma maior bioconcentração de PIR, visto que bivalves nesse estágio de maturação apresentam maior concentração de HPA nos tecidos (González-Fernandez et al., 2016). No presente estudo a menor bioconcentração e consumo de PIR em fêmeas e machos podem ter sido influenciados pelo estágio avançado (pré-desova) das gônadas (Fig. 16), já que o período reprodutivo de bivalves está intimamente relacionado ao ciclo de armazenamento de biomoléculas (Gabbott, 1975; González-Fernandez et al., 2016).

O ciclo reprodutivo dos bivalves é anual e envolve um período de gametogênese seguido de uma desova única estendida, ou por vários eventos de desova (Gosling, 2003). O ciclo reprodutivo de *C. gasar* difere entre as regiões Sul, Sudeste e Norte do Brasil (Gomes et al., 2014; Montanhini Neto et al., 2012; Paixão et al., 2013; Galvão et al., 2000). Em Santa Catarina, por exemplo, o estágio pré-desova foi observado em indivíduos cultivados entre os meses de novembro e dezembro, quando ocorre uma maior predominância de fêmeas aptas à liberação de gametas (Gomes et al., 2014). A exposição a HPA pode causar efeitos deletérios em bivalves como: atrofia do epitélio germinativo, redução no volume de gametas, redução de células de armazenamento, e aumento dos níveis de atresia no oócito (Barszcz et al., 1978; Lowe; Pipe, 1985; Lowe, 1988). Entretanto, indivíduos da mesma espécie, mas de sexo oposto diferem em relação à suscetibilidade ao estresse químico (Hines, 2007; Schäfer et al., 2011; Xiu et al., 2015). Portanto, a identificação do sexo e período reprodutivo podem ser determinantes para avaliar o efeito dos biomarcadores após a exposição a HPA.

Com relação a genes envolvidos com a reprodução, quando se analisa a expressão de mRNA de *Vitelogenina* (proteína essencial para a maturação dos oócitos), observou-se que o nível de transcritos desse gene nas brânquias de *C. gasar* variou conforme o sexo. Os níveis de transcritos da *Vitelogenina* foram significativamente maiores em fêmeas, quando comparado a machos ($p < 0,05$), em concordância com outros estudos em bivalves (Boutet et al., 2008; Moncaleano-Niño et al., 2017). A vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína de alta massa molecular produzida na maioria dos animais ovíparos e ovovivíparos durante o processo de formação do vitelo, a vitelogênese (Tran et al., 2019). São os principais precursores das vitelinas, que fornecem reservas de energia para o desenvolvimento embrionário (Matozzo et al., 2008; Tran et al., 2019) e tem sido utilizada como biomarcador do estado reprodutivo e de

exposição a compostos desreguladores endócrinos (DEs) (Matozzo et al., 2008; Moncaleano-Niño et al., 2017). Os níveis de vitelogenina podem variar consideravelmente ao longo da vida de uma ostra e tende a ser maior em fêmeas adultas (Moncaleano-Niño et al., 2017). Até o momento, poucos estudos em nível molecular foram avaliados em relação a genes específicos envolvidos em mecanismos de reprodução em bivalves expostos a HPA.

Embora ainda desconhecidos seus mecanismos, os moluscos marinhos são capazes de biotransformar o PIR (Bustamante et al., 2012; Earl et al., 2016; Zacchi et al., 2019). Neste estudo, diferenças significativas dos níveis de transcritos dos genes de biotransformação de xenobióticos foram encontradas apenas na fase I, pertencentes à superfamília citocromo P450 (CYP). Sabe-se que em invertebrados aquáticos, o metabolismo de HPA como o benzo[a]pireno (B[a]P) e pireno é mediado por enzimas do complexo CYP450 (Rewitz et al., 2006). Em bivalves, membros da família CYP2 estão envolvidos na biotransformação de HPA (Peters et al., 1998) e toxinas (Wei et al., 2019). Em moluscos, os membros da família CYP2 fazem parte do Clã 2. Esse, em análise do genoma de *Crassostrea gigas*, aparece como o maior clã de CYPs, sugerindo um importante papel metabólico destes genes em ostras (Zhang et al., 2012b). Neste estudo, o *CYP2AUI* foi o único gene que apresentou aumento significativo nos níveis de transcritos ($p < 0,05$) em brânquias de machos expostos a P1 (PIR 0,25 μM), quando comparado ao grupo controle (Fig. 17). O sinal de hibridização de transcritos do *CYP2AUI* também foi observado no manto e divertículo digestivo de fêmeas e machos expostos ao PIR (Fig. 18). Ainda que pouco se saiba sobre a função biológica do *CYP2AUI*, o nível de transcritos desse mesmo gene em brânquias, glândula digestiva, intestino e manto de *C. gasar* foi afetado após exposição ao fenantreno (Dos Reis et al., 2015; Lima et al., 2018, 2019; Lüchmann et al., 2014; Zacchi et al., 2017) e também após exposição a PIR e fluoreno em brânquias de *C. gasar* (Zacchi et al., 2019). O possível ortólogo de *CYP2AUI* em *C. gigas*, o *CYP2AU2*, apresentou maior nível de transcritos em brânquias de ostras expostas a fluoreno (dados não publicados). Esses resultados sugerem uma importante participação do gene *CYP2AUI* no metabolismo de HPA de ostras do gênero *Crassostrea*.

Biomarcadores histopatológicos, como as alterações observadas no divertículo digestivo de moluscos, estão envolvidos nos processos de acumulação, desintoxicação e eliminação de contaminantes (Arrighetti et al., 2019). Nesse sentido, a morfologia dos túbulos digestivos e o tipo da composição do epitélio celular são úteis para a compreensão do impacto e dos fatores de estresse causado pelos xenobióticos (Aarab et al., 2008; Arrighetti et al., 2019; Garmendia et al., 2011). Alterações na estrutura dos divertículos digestivos de ostras expostas a PIR foram observadas neste estudo. Quando comparado ao grupo controle, um

aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de atrofia tubular foi observado em machos de *C. gasar* expostos a P2 (Fig. 14), sugerindo à susceptibilidade do divertículo digestivo de machos a exposição a esse contaminante. Alterações no divertículo digestivo, como a atrofia tubular, vem sendo constantemente descrita em bivalves expostos a contaminantes ambientais (Cajaraville et al., 1992; Do-Hyung Kang et al., 2010; Garmendia et al., 2011; Matozzo et al., 2018) e a HPAs (Al-Subiai et al., 2012; Bignell et al., 2011; Cuevas et al., 2015; dos Reis et al., 2015; Zacchi et al., 2019). Entretanto, a comparação desta resposta entre fêmeas e machos de bivalves expostos a contaminantes ambientais ainda carece de mais estudos.

4.7 CONCLUSÃO

Fêmeas e machos em estágio de pré-desova bioconcentraram PIR em seus tecidos, porém o estágio reprodutivo pode ter influenciado em uma menor concentração desse contaminante nos tecidos. Machos apresentaram maior sensibilidade a exposição a PIR, níveis de transcritos de *CYP2AUI* foram induzidos em machos, assim como a atrofia tubular foi observada apenas em machos expostos a PIR. Níveis de transcritos do gene da *Vitelogenina* foram menores em machos corroborando com outros estudos. Apesar de poucos genes-alvo utilizados neste estudo apresentarem respostas significativas quando foram comparados fêmeas e machos expostos a PIR, sugere-se o gene *CYP2AUI* como potencial biomarcador de exposição ao PIR em ostras do *C. gasar* e deve ser considerado o estado reprodutivo e o sexo, como possíveis interferentes nas respostas de biomarcadores em condições controladas de laboratório.

REFERÊNCIAS

- Aarab, N., Pampanin, D.M., Navdal, A., Øysaed, K.B., Gastaldi, L., Bechmann, R.K., 2008. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). Mar. Pollut. Bull. 57, 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.045>.
- Al-Subiai, S.N., Arlt, V.M., Frickers, P.E., Readman, J.W., Stolpe, B., Lead, J.R., Moody, A.J., Jha, A.N., 2012. Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: an integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C 60 fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 745, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.019>.
- Arienzo, M., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Ferrara, L., Stanislao, C., Donadio, C., Grazia, V., Gionata, V., Carella, F. 2019. Contaminants bioaccumulation and pathological assessment in

Mytilus galloprovincialis in coastal waters facing the brownfield site of Bagnoli, Italy. Mar. Poll. Bull. 140, 341–352. doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.012

Arrighetti, F., Landro, S.M., Lambre, M.E., Penchaszadeh, P.E., Teso, V., 2019. Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. Mar.Poll.Bull. 140, 451–461. oi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.002

Barroso-Chinea, P., Aymerich, M.S., Castle, M.M., Pérez-Manso, M., Tuñón, T., Erro, E., Lanciego, J.L., 2007. Detection of two different mRNAs in a single section by dual in situ hybridization: a comparison between colorimetric and fluorescent detection. J. Neurosci. Methods 162, 119–128, http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.12.017.

Barszcz, C., Yevich, P.P., Brown, L.R., Yarbrough, J.D., Minchew, C.D. 1978. Chronic effects of three crude oils on oysters suspended in estuarine ponds. J. Environ. Pathol. Toxicol and Oncol. 1, 879-896.

Bignell, J.P., Stentiford, G.D., Taylor, N.G.H., Lyons, B.P., 2011. Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. Mar. Environ. Res. 72, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.05.004.

Boutet, I., Moraga, D., Marinovic, L., Obreque, J, Chavez-Crooker, P. 2008. Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: Influence of maturation stage and sex on mRNA expression. Gene. 15.407(1-2). 10.1016/j.gene.2007.10.005

Bustamante, P., Luna-Acosta, A., Clamens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolism of ¹⁴C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. Chemosphere 87, 944–950. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.049.

Briaudeau, T., Zorita I., Cuevas, N., Franco, J. Marigómez, I. Izagirre, U. 2019. Multi-annual survey of health status disturbance in the Bilbao estuary (Bay of Biscay) based on sediment chemistry and juvenile sole (*Solea* spp.) histopathology. Mar. Poll. Bull. 145, 126–137.

Cajaraville, M.P., Marigómez, I., G., D., Angulo, E., 1992. Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels-2. Quantitative alterations in the structure of the digestive tubules. Comp. Biochem. Physiol. 102 (C), 113–123.

Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P.M., Franco, J., Larreta, J., 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. Aquat. Toxicol. 162, 152–164. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011.

Dos Reis, I.M.M., Mattos, J.J., Garcez, R.C., Zacchi, F.L., Miguelão, T., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M., Cargnin-Ferreira, E., Bairy, A.C.D., 2015. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2A1) in *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene. Aquat. Toxicol. 169, 79–89. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.011.

Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Penneç, M. 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacul. Int.* 17, 491-506. doi.org/10.1007/s10499-008-9219-1

Ertl, G. N., O'Connor, W., Brooks, P., Keatsa, M., Elizur, A., 2016. Combined exposure to pyrene and fluoranthene and their molecular effects on the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquat. Toxicol.*, 177, 136–145. doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.012

Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Proc. 9th Eur. Mar. Biol. Symp.*, 191–211.

Galvão, M.S.N.; Pereira, O.M.; Machado, I.C.; Henrique, M.B. 2000. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliensis* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25°S; 48°W). *Bol. Inst. Pesca.* 26, 147-162.

Galtsoff, P.S., 1964. The American Oyster, *Crassostrea Virginica* Gmelin. U.S. Fish Wildl. Serv., Fish. Bull., 64: 480 pp.

Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 2011. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *J. Environ. Monit.* 13, 915–932.

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

Gomes, C.H.A.M.; Silva, F.C; Lopes, G.R.; Melo, C.M.R., 2014. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. *Braz. J. Biol.* 74, 967-976.

González-Fernández, C., Albentosa, M., Campillo, J.A., Viñas, L., Franco, A., Bellas, J. 2016. Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs *Aquat. Toxicol.* 177, 380–394. doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.012

Guo, X. M.; Hedgecock, D.; Hershberger, W. K.; Cooper, K.; Allen, S. K. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* v.52, p.394–402, 1998.

Henke, R.T., Eun Kim, S., Maitra, A., Paik, S., Wellstein, A., 2006. Expression analysis of mRNA in formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues by mRNA in situ hybridization. *Methods* 38, 253–262, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.013>.

Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*, 5. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, pp. 218.

Hines, A., Yeung, W.A., Craft, J., Brown, M., Kennedy, J., Bignell, J., Stentiford, G.D., Viant, M., 2007. Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. *Anal. Biochem.*, 369, 175–186.

Ito, T., 1978. Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: the O₂ hypothesis as a driving force in recent research, *J. Photochem. Photobiol.* 28, 493-506.

Kang, Do-Hyung, Chu, Fu-Lin E., Yang, Hyun-Sung, Lee, Chang-Ho, Koh, Hyeong-Beom, Choi, Kwang-Sik, 2010. Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the Southern Coast of Korea. *J. Shellfish Res.* 29 (4), 839–845. <https://doi.org/10.2983/035.029.0418>.

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

Lima, D., Zacchi, F.L., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Gomes, C.H.A. de M., de Mello, Á.C.P., Siebert, M.N., Piazza, C.E., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bicego, M.C., Bebianno, M.J., de Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., 2018. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene. *Chemosphere* 209, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.094>

Lima, D., Mattos, J.J., Piazza, R.P., Righetti, B.P.H., Monteiro, J.S., Grott, S.C., Alves, T.C., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Almeida, E.A., Bebianno, M.J., Medeiros, I.D., Bainy, A.C.D. 2019. Stress responses in *Crassostrea gasar* exposed to combined effects of acute pH changes and phenanthrene. *Sci. Total. Environ.* 678, 585–593.

Lotufo, G.R. Fleeger, J.W. 1996. Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (oligochaeta: Tubificidae), *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1508-516.

Lowe, D. M.; Pipe, R. K. 1985. Cellular responses in the mussel *Mytilus edulis* following exposure to diesel oil emulsion: Reproductive and nutrient storage cells. *Mar. Environ. Res.* 17, 234-237.

Lowe, D. M. 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog.* 46, 91-100.

Lüchmann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan, R., Craft, J.A., Meng, X., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C., Bainy, A.C.D., 2014. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.* 152, 324–334. doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.021

Lüchmann, K.H., Clark, M.S., Bainy, A.C.D., Gilbert, J.A., Craft, J.A., Chipman, J.K., Thorne, M.A., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Schroeder, D.C., 2015. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. *Aquat. Toxicol.* 166, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.012>.

MacLeod, W.D., Brown, D.W., Fiedman, A.J., Burrows, D.G., Maynes, O., Pearce, R.W., Wilgren, C.A., Bogar, R.G., 1985. Standard analytical procedures of the NOAA national analytical facility, 1985–1986. Extractable Toxic Organic Components, 2nd ed. U. S. Department of Commerce NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92,121.

- Martín-Díaz, M.L., Blasco, J., Sales, D., Del Valls, T.A., 2004. et al. Biomarkers as tools to assess sediment quality: Laboratory and field surveys. *Trac-Trend Anal Chem.* 23, 807- 18. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.012>.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ. Int.* 34, 531–545
- Moncaleano-Niño, A.M., Barrios-Latorre, S.A., Poloche-Hernández, J.F., Becquet, V., Huet V., Villamil, L., Thomas-Guyon, H., Ahrens, M.J., Luna-Acosta, A. 2017. Alterations of tissue metallothionein and vitellogenin concentrations in tropical cup oysters (*Saccostrea* sp.) following short-term (96 h) exposure to cadmium. *Aquat Toxicol.* 185:160-170. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.02.011.
- Montanhini Neto, R.M.; Zeni, T.O.; Ludwig, S.; Horodesky, A.; Giroto, M.V.F.; Castilho-Westphal, G.G; Ostrensky, A. 2012. Influence of environmental variables on the growth and reproductive cycle of *Crassostrea* (Mollusca, Bivalvia) in Guaratuba Bay, Brazil. *Invert. Reprod. Develop.* 57, 208-218.
- Oliveira, M. Gravato, C. Guilhermino, L. 2012. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): mortality, biomarkers and swimming performance, *Ecol. Indic.* 19, 206-214.
- Paixão, L.; Ferreira, M.B.; Nunes, Z.; Fonseca-Sizoa, F.; Rocha, R. 2013. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster *Crassostrea gasar*: Implications for the collection of broodstock oysters. *Aquaculture.* 380-383, 6-12.
- Peters, L.D., Nasci, C., Livingstone, D.R. 1998. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms: epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 121:361-9. 10.1016/s0742-8413(98)10057-9
- Puchnick-Legat, A., Legat, J.F.A, Gomes, C.H.A.M., SuhneL, S., Melo, C.M.R. 2015. Anesthesia in oysters of the genus *Crassostrea* cultured in Brazil. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 41, 785 – 793.
- Ramos, O.C., Ferreira, J.F., Melo, C.M.R., 2013. Maturation of native oyster *Crassostrea gasar* at different diets in the laboratory. *Bol. Inst. Pesca* 39,107–120.
- Rewitz, K.F., Styris, B., Løbner-Olsen, A., Andersen, O. 2006. Marine invertebrate Cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 143, 363–381. 10.1016/j.cbpc.2006.04.001
- Schäfer, S., Abele, D., Weihe, E., Köhler, A. 2011. Sex-specific biochemical and histological differences in gonads of sea urchins (*Psammechinus miliaris*) and their response to phenanthrene exposure. *Mar. Environ. Res.* 71,70-78. 10.1016/j.marenvres.2010.10.004
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

Suquet, M.; Kermoisan, G.; Araya, R.G.; Queau, I.; Lebrun, L.; Souchu, P.L.; Mingant, C. 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 22, 29–34.

Tran, T.K.A., Yu, R.M.K., Islam, R., Nguyen, T.H.T., Bui, T.L.H., Kong, R.Y.C., O'Connor W.A., Leusch, F.D.L., Andrew-Priestley, M., MacFarlane, G.R. 2019. The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs *Environ. Pollut.* 248:1067-1078. doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.056

Xie, J., Zhao, C., Han, Q., Zhou, H., Li, Q., Diao, X., 2017. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. *Fish. Shellfish. Immun.* 63, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.032>.

Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., 2016. Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44, 75–83. doi:10.1016/j.etap.2016.04.001

Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., Miao, J., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 170, 50–59. doi:10.1016/j.cbpc.2015.02.003

Wei, X.M., Lu, M.Y., Duan, G.F., Li, H.Y., Liu, J.S., Yang, W.D. 2019. Responses of CYP450 in the mussel *Perna viridis* after short-term exposure to the DSP toxins-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 176:178-185. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.073.

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

Zacchi, F.L., Lima, D., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Gomes, C.H.A., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Bainy, A.C.D., 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene at different salinities. *Aquat. Toxicol.* 183, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.016>.

Zacchi, F.L., dos Reis, I.M.M., Siebert, M.N., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Piazza, C.E., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Bainy, A.C.D. 2019. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - Part I. *Aquat. Toxicol.* 216, 105318. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105318.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Loso, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, Q., Steinberg, C.E., Wang, H.,

Qian, L., Liu, X., Yin, Y., 2012b. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>.

Zhou, J.L., Fileman, T.W., Evans, S., Donkin, P., Llwellyn, C., Readman, J.W., Mantoura, R.F.C., Rowland, S.J., 1998. Fluoranthene and pyrene in the suspended particulate matter and surface sediments of the Humber Estuary, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 587–597.

CAPÍTULO 5

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste estudo, no capítulo 2, observou-se que PIR e FLU foram capazes de ativar a transcrição de genes codificantes de isoformas de citocromo P450 sugerindo um aumento na capacidade de biotransformação, e ainda assim bioconcentram esses HPA nos tecidos de ostras *C. gasar*. O estágio reprodutivo de pós-desova (repouso/indeterminado) possivelmente influenciou a bioconcentração desses contaminantes. Ostras *C. gasar* bioconcentraram maior quantidade de PIR por ser mais lipossolúvel, o que possivelmente está relacionado a uma maior resposta histológica, de localização e de expressão de mRNA de *CYP2AUI* em diferentes tecidos. Foi observado um aumento dos níveis de transcritos de *CYP2AUI* em ostras expostas a PIR e FLU sugerindo o uso desse gene como potencial biomarcador de exposição a esses HPA em *C. gasar*. Além disso, níveis elevados de PIR foram observados em tecidos de *C. gasar* associados a aumento de mucócitos no manto como mecanismos de defesa, e ao aparecimento de atrofia tubular nos divertículos digestivos e o sinal de *CYP2AUI* em brânquias, manto e divertículos digestivos.

No capítulo 3, a menor solubilidade do PIR em água em relação ao FLU foi associada ao menor tempo de meia-vida desse HPA na água dos tanques com ostras e às altas concentrações bioconcentradas nos tecidos das ostras *C. gigas*. Assim como no Capítulo anterior (exposição com *C. gasar*), foi observado que a exposição ao PIR causou alterações histológicas, como atrofia tubular em divertículos digestivos associado ao estágio reprodutivo de pós-desova (fase Inativa) em ostras *C. gigas*. Ostras *C. gigas*, em estágio maduro de maturação gonadal, expostas a maior concentração de FLU apresentaram um aumento no número de células mucosas no manto demonstrando um mecanismo de defesa da espécie em resposta a exposição a esse HPA. Esses resultados sugerem que PIR e FLU podem causar danos aos tecidos de ostras *C. gigas*, no entanto diferentes estádios reprodutivos podem potencialmente mudar a forma como as ostras respondem à exposição aos HPA.

Diante dos resultados apresentados no capítulo 1 e 2, juntamente com dados complementares a este estudo com resultados de análises enzimáticas e moleculares com a ostra *C. gasar* (ZACCHI et al., 2019) e *C. gigas* (SIEBERT, 2017), foi possível determinar a espécie *C. gasar* como sendo a mais responsiva a exposição a HPA, principalmente quando exposta a PIR. Diante disso, no capítulo 4, foi realizado um o estudo com fêmeas e machos da espécie *C. gasar* em estágio de pré-desova com o intuito de investigar o efeito do gênero no

metabolismo desses animais após a exposição a PIR. Neste capítulo, fêmeas e machos bioconcentraram PIR em seus tecidos, porém o estágio reprodutivo de pré-desova pode ter influenciado a menor concentração desse contaminante nos tecidos. Machos apresentaram maior sensibilidade a exposição a PIR, níveis de transcritos de *CYP2AUI* foram induzidos em machos, assim como a atrofia tubular foi observada apenas em machos expostos a PIR. Níveis de transcritos do gene da *Vitelogenina* foram menores em machos corroborando com outros estudos. O gene pertencente à família do citocromo P450 (*CYP2AUI*) apresentou respostas significativas quando comparado fêmeas e machos expostos a PIR, sugerindo este gene como potencial biomarcador de contaminação por HPA em ostras do gênero *Crassostrea*.

Fundamentando em uma análise global, deve-se levar em consideração a integração dos biomarcadores moleculares, histológicos e bioquímicos com os dados químicos para um melhor diagnóstico dos efeitos deletérios causados pela a exposição aos contaminantes ambientais. Além disso, aspectos reprodutivos e identificação do estágio sexual, devem ser considerados na realização de estudos com biomarcadores. Foi observado neste estudo que o estágio reprodutivo pode influenciar na bioconcentração de contaminantes, no nível de transcritos e em alterações histológicas.

Diante destas considerações, é importante destacar a necessidade de realização de mais estudos que reforcem os resultados desta tese. Mais estudos deverão ser conduzidos para avaliar o efeito de exposição a HPA em *C. gigas* com o mesmo estágio reprodutivo. Além disso, para efeito de estudos que envolvam biomarcadores de contaminação aquática, é oportuno frisar a necessidade da avaliação de respostas moleculares em outras vias e processos metabólicos, bem como em outros tecidos de *C. gasar* e *C. gigas*, frente à exposição a HPA, concentrações e períodos de exposição diferentes dos avaliados nesta tese.

REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDEL-SHAIFY, I. Hussein; MANSOUR, M. S. Mona. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egypt. J. Pet.** v.1, p.107–123, 2015.

AGUDO, I. **Panorama da Malacocultura no Brasil.** 2008. Disponível em: <http://www.conchasbrasil.org.br/materias/malacocultura/index.asp>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ALEGBELEYE, O.Oluwadara; OPEOLU, B. Olutoyin; JACKSON, Vanessa. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. **Braz. J. Microbiol.** v.48, p.314–325. 2017.

ALVES, Rafael. **Estudo taxonômico de ostras do gênero *Crassostrea Sacco, 1897, da região da Grande Florianópolis – Brasil.*** 2004. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

ARANA, Luis Vinatea. **Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídio para a formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira.** Ed. UFSC. Florianópolis, 1999.

BARNABÉ, Gilbert, **Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura,** Edotirial Acribia, Zaragoza, 1996.

BEACH, G. Daniel, HELLOU, Jocelyne. Bioaccumulation and biotransformation of 1-hydroxypyrene by the marine whelk *Neptunea Lyrata*. **Int. J. Environ. An. Ch.** v.91, p.1227–1243, 2011.

BUTT, Daniel et al., Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). **Aquaculture.** v.275, p.342-346, 2008.

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

DOMINGOS, V. X. Fabíola. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** 2006. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Programa de PósGraduação em Biologia Celular e Molecular - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DOS REIS, Isis Mayna Martins. **Histopatologia e hibridação in situ de citocromo P450 (*CYP2A1*) em ostras *Crassostrea brasiliiana* expostas ao fenantreno.** 2014. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

DOUBEN, E.T. Peter. (Ed). **PAH: An Ecotoxicological Perspective.** John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, 2003.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food**. EFSA J. 724, 1–114, 2008.

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

EPAGRI (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA). **Síntese Informativa da Maricultura**. [s.l.] : Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, 2017. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br>. Acesso em: 19 out. 2019.

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

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. [s.l.: s.n.]. DOI: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FLORES-NUNES, Fabrício. **Avaliação in situ da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do pacífico *Crassostrea gigas* na baía norte da ilha de Santa Catarina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GALTSOFF, P. S. **The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)**. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service, 64: 1- 480. 1964.

GOSLING, Elizabeth. **Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture**. 2 ed ed.9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK, 2003.

GOMES, Carlos Henrique Araújo de Miranda et al., The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Braz. J. Biol.** v. 74, n. 4, p. 967-976. 2014.

GOMES, Rafaela Pino. **Transcrição de genes Citocromo p450 em ostra *Crassostrea gigas***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação e Biociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GUO, Ruiming *et al.* The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. **Comp. Biochem. Phys. C.** v. 191, p. 36–51, 2017.

HAMESTER, Michele Regina Rosa; BALZER, Palova Santos; BECKER, Daniela. Characterization of calcium carbonate obtained from oyster and mussel shells and incorporation in polypropylene. **Mater. Res.** v. 15, n. 2, p. 204–208, 2012.

HINTON, D. E. *et al.* **Histopathologic Biomarkers**. Boca Raton, Lewis Publishers, 1992.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Típicos de Santa Catarina, moluscos estão pela primeira vez no Censo Agro**. 2019. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/19621-tipicos-de-santa-catarina-moluscos-estao-pela-primeira-vez-no-censo-agro>. Acesso em: 18 out. 2019.

JENNY, J. Matthew *et al.* Transcriptomic evaluation of the American oyster, *Crassostrea virginica*, deployed during the Deepwater Horizon oil spill: Evidence of an active hydrocarbon response pathway. **Mar. Environ. Res.** v. 120, p. 166–181, 2016.

JESUS, B. Taíse; CARVALHO, E. V. Carlos. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (hg). **Oecol. Bras.**, v.12, n.4, p.680-693, 2008.

LEGAT, Jefferson Francisco Alves. **Reprodução e cultivo da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), nos estados do Maranhão e Santa Catarina**. 2015. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

LINS, A.P.N. José *et al.* Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 8, p. 469-484, 2010.

LOPES, Gustavo Ruschel. **Crescimento da ostra-do-mangue *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) cultivada em dois ambientes no estado de Santa Catarina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LÜCHMANN, Karim Hahn. **Respostas Bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais**. 2012. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MAIOLI, L.G. Otávio *et al.*, Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. **J. Braz. Chem. Soc.** v.21, p.1543–1551, 2010.

MARENZI, Adriano W. C.; CASTILHO-WESTPHAL, Gisela G. **Cultivo de organismos aquáticos - Malacocultura**. Curitiba, 2011.

MARIGOMEZ, I; LEKUBE, X; CANCIO, I, Immunochemical localisation of proliferating cells in mussel digestive gland tissue, **Histochem. J.** v. 31, n. 12, p. 781-788. 1999.

MARIGOMEZ, Ionan *et al.*, Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks, **Microsc. Res. Tech.** v. 56, n. 5, p. 358–392, 2002.

MATHERS, F. Nigel. The tracing of a natural algal food labeled with a carbon 14 isotope through the digestive tract of *Ostrea edulis*. **J. Mollusc. Stu.** v.40, p.115–24, 1972.

MARTÍNEZ-GARCÍA, Caroline; GONZÁLEZ-FONTEBOA, Belén; CARRO-LÓPEZ, Diego; MARTÍNEZ-ABELLA, Fernando. Recycled mollusc shells. **New Trends in Eco-efficient and Recycled Concrete**. p. 191–205, 2019.

MARTINS, Marta et al., Effects of carcinogenic versus non-carcinogenic AHR-active PAHs and their mixtures: Lessons from ecological relevance. **Environ. Res.** v.138, p.101–11, 2015.

MAYER, Philipp, REICHENBERG, Fredrik. Can highly hydrophobic organic substances cause aquatic baseline toxicity and can they contribute to mixture toxicity. **Environ. Toxicol. Chem.** v.25, p.2639–2644, 2006.

MEIRE, Rodrigo; AZEREDO, Antônio; TORRES, P. M. Joao. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**. p.11, 2007 .

MUANGCHINDA, Chanokporn *et al.*, Biodegradation of high concentrations of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous bacteria from a river sediment: a microcosm study and bacterial community analysis. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v.24, p.4591–4602, 2017.

NASCIMENTO, A. Iracema; PEREIRA, A. Solange; SOUZA, C. Raimundo. Determination of the optimum commercial size for the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*) in Todos os Santos Bay, Brazil. **Aquaculture**, v. 20, p. 1-8. 1980.

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

O'CONNOR, P. Thomas; BELIAEFF, Benoit. Recent trends in coastal environmental quality: Results from the Mussel Watch Project. National Status and Trends Program, U.S. **National Oceanic and Atmospheric Administration**, Silver Spring, MD. 1995

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

PAULILO, María. Maricultura e território em Santa Catarina - Brasil. **Geosul**, [S. l.], v. 17, n. 34, p. 87–112, 2002.

PESSATI, B. Thomas *et al.* Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil., **Ecotoxicol. Environ. Saf** . v. 131, p. 172-180, 2016.

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

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

- RAMOS, Cassio de Oliveira. **Larvicultura de *Crassostrea gigas* em sistema de recirculação (RAS)**. 2018. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- RAVELET, Corinne *et al.*, Biodegradation of pyrene by sediment fungi. **Chemosphere**. v.40, p.557–563, 2000. doi:10.1016/S0045-6535(99)00320-3
- REECE, Kimberly S. *et al.* Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. **Mar. Biol.** v. 153, n. 4, p. 709-721, 2008.
- RUPP, Guilherme Sabino; DE OLIVEIRA NETO, Francisco Manoel; GUZENSKI, João. **Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores q afectan su sustentabilidad en América Latina**, [S. l.], p. 77–89, 2008.
- RUPPERT, E. Edward; FOX, S. Richard; BARNES, D. Robert, **Zoologia dos invertebrados**. Editora Roca LTDA, 7ª edição, São Paulo, 2005.
- SALVI, Danieli; MACALI, Armando; MARIOTTINI, Paolo. Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family *Ostreidae* based on rRNA sequence structure models and multilocus species tree. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 19–21, 2014.
- SAIKIA, Nabajyoti; DE BRITO, Jorge. **Use of plastic waste as aggregate in cement mortar and concrete preparation: A review**. Construction and Building Materials, [S. l.], v. 34, p. 385–401, 2012.
- SHAW, Barbara L.; BATTLE, Helen I. the Gross and Microscopic Anatomy of the Digestive Tract of the Oyster *Crassostrea Virginica* (Gmelin). **Can. J. Zool.** v. 35, n. 3, p. 325–347, 1957.
- SHATKIN, Greg; SHUMWAY, E. Sandra; HAWES, Robert. Considerations regarding the possible introduction of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: A review of global experience. **Oceanogr. Lit. Rev.** v. 9, n. 45, p. 1677, 1998.
- SINDERMANN, C. J. **Effects on Living Resources and Humans**. Ocean Pollution. CRC Press, Boca Raton, 1996.
- SUQUET, Marc *et al.*, Anesthesia in Pacific oyster , *Crassostrea gigas*. **Aquat. Living Resourv.** 34, p. 29–34, 2009.
- VÉLEZ, A. Crecimiento, edad y madurez sexual del ostión *Crassostrea rhizophorae* de Bahía de Mochima. **Bol. Inst. Oceanog. Univ. Oriente**, v. 15, n. 1, p. 65-72, 1976.
- XIU, Meng, PAN, Luqing, JIN, Quian, Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.44, p.75–83, 2016.
- XIU, M. *et al.*, Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.** v.170, p.50–59, 2015.

WAKAMATSU, Takeshi. **A ostra de Cananéia e seu cultivo**. São Paulo: SUDELPA - Instituto Oceanográfico, USP, p.141, 1973.

WALKER, H. Colin *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

WAN, Qiang. *et al.* Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress. **Comp. Biochem. Physiol. Part - C**, v. 150, n. 4, p. 558–568, 2009.

WANG, Yongping; XU, Zhe; GUO, Ximing. Differences in the rDNA-bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca). **Biol. Bull.** v. 206, n. 1, p. 46-54, 2004.

ZACCHI, L. Flávia. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) elicited by pyrene and fluorene: molecular, biochemical and histological approach - Part I. **Aquat. Toxicol.** v.216, p.105318, 2019.

ZANETTE, Juliano. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes**. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ZORITA, Izaskun *et al.* Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environ. Poll.** v.153, p.157-168, 2008.