



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

**AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES E RESPOSTAS
ENZIMÁTICAS EM OSTRAS DO PACÍFICO *Crassostrea gigas*
(THUNBERG 1793) EXPOSTAS A EFLUENTES DOMÉSTICOS
E DEPURADAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Rômi Sharon Piazza

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

P584a Piazza, Rômi Sharon

Avaliação da transcrição de genes e respostas enzimáticas em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) expostas a efluentes domésticos e depuradas [dissertação] / Rômi Sharon Piazza ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy. - Florianópolis, SC, 2012.

79 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Molusco. 3. Esgotos. 4. Estresse Oxidativo. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

Avaliação da transcrição de genes e respostas enzimáticas em ostra do pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) exposta a efluentes domésticos e depurados

Por

RÔMI SHARON PIAZZA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Afonso Celso Dias Bainy – *Orientador*

Dr. Carlos Peres Silva

Dr. Luis Antônio de Oliveira Proença

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, que me encorajaram e me deram suporte para ingressar no mestrado e que seguem comigo, me apoiando e me guiando sempre que preciso.

Agradeço ao Dr. Marcelo Maraschin, que ajudou a clarear meus pensamentos quando as dúvidas e indecisões surgiram. Depois de suas colocações os caminhos que precisei trilhar se tornaram mais harmoniosos.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Afonso Celso Dias Bainy, que atendeu prontamente meu pedido e me deu a oportunidade de conhecer e aprender sobre o mundo dos biomarcadores.

Agradeço ao Jacó, pelas horas de dedicação e ensinamentos. Com certeza essa “aquisição” foi muito valiosa para o NEPAQ.

Agradeço ao Fabrício, que foi responsável pelo delineamento experimental do presente estudo; também pela amizade e prestatividade.

Agradeço a todas as pessoas do LABCAI que me ajudaram, me ensinaram, foram pacientes e gastaram seu tempo para que eu pudesse finalizar minhas análises em tempo hábil. Se eu citar nomes, precisarei mencionar praticamente a equipe inteira, pois cada um, de alguma forma, me ajudou e essa grande família que formamos realmente me dá forças para continuar.

Agradeço ao CNPq (edital MAPA/SDA) que apoiou financeiramente o projeto intitulado “IMPLEMENTAÇÃO DE TÉCNICAS DE DEPURAÇÃO DE OSTRAS DE CULTIVO QUE VISEM GARANTIR A QUALIDADE E INOCUIDADE DO PRODUTO” (Processo no 578200/2008-2) e concedeu minha bolsa de estudos.

Agradeço a Dr^a Célia Regina Monte Barardi, MsC. Doris Sobral Marques de Souza e MsC. Vanessa Moresco, do LVA - UFSC, que fizeram parte do projeto de depuração MAPA e organizaram o trabalho em campo e a manutenção das depuradoras.

“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito”.

(Aristóteles)

RESUMO

A poluição das águas é uma questão fundamental e preocupante atualmente, sendo que muitas cidades não possuem sistema de abastecimento e tratamento de água e esgoto. Assim, os microrganismos patogênicos são transmitidos por via oral-fecal aos humanos e são comumente encontrados em moluscos bivalves por serem animais filtradores. A capacidade de bioacumulação de xenobióticos em seus tecidos é alta e quando consumidos crus aumenta a probabilidade de contaminação viral e aquisição de outras doenças em humanos. Estudos realizados com tratamentos de depuração utilizando radiação ultravioleta demonstraram ser eficientes contra organismos patogênicos de várias espécies. No presente estudo, realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil, propõe-se a utilização de dois tratamentos de depuração distintos, um com a utilização de radiação ultravioleta e recirculação de água e outro somente com recirculação de água para a melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a contaminação, biotransformação e detoxificação de poluentes em ostra, *Crassostrea gigas* oriundas de dois locais distintos, apto para cultivo e contaminado. Enzimas antioxidantes e genes transcritos foram analisados para verificar a possibilidade de utilização destes como biomarcadores de contaminação aquática em *C. gigas* após depuração. As respostas enzimáticas apresentaram maior variação nos tecidos de *C. gigas* provenientes do local contaminado, sofrendo aumento na atividade das enzimas CAT, GPx, G6PDH e GST na brânquia e glândula, e redução da atividade da SOD na brânquia e da atividade da G6PDH na glândula quando aplicado o tratamento de depuração. As ostras oriundas do local apto para cultivo apresentaram uma maior a atividade das enzimas CAT e G6PDH após a depuração e a atividade da GST foi reduzida. Foi observado um padrão de diminuição da taxa de transcrição dos genes, *FABP*, *GSTO* e *CYP_{356A1}* na brânquia destes organismos. Os resultados sugerem que os tratamentos de depuração podem ser utilizados como sistema complementar de detoxificação dos xenobióticos e microrganismos para organismos presentes em locais de cultivo de ostras *C. gigas*, pois atuam minimizando o estresse oxidativo causado por poluentes e patógenos.

Palavras-chave: moluscos, esgoto doméstico, ultravioleta, expressão de genes, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Water pollution is a fundamental and concern question nowadays. Many cities do not have sewage collection system and treatment plant. Thus, pathogenic microorganisms are transmitted by water for humans and commonly found in shellfish, being filter feeding animals. The bioaccumulation potential of xenobiotics in their tissues is high and when eaten raw, there is a high probability on humans contracting virus infections and other diseases. Studies on depuration treatments using ultraviolet light proved to be effective against pathogenic organisms of many species. In the present study, carried out at the Island of Santa Catarina, Brazil, we propose the use of two different purification treatments, one using an ultraviolet radiation and water recirculation and the other using only water recirculation to get a better understanding on the mechanisms involving contamination, biotransformation and detoxification of oyster pollutants, *Crassostrea gigas* from two sites, an oyster farm area and a contaminated site. Antioxidant enzymes and transcripts genes were analyzed to verify the possible use of these as biomarkers of water contamination in *C. gigas* after purification treatments. The enzymatic responses were more expressive in the tissues of *C. gigas* from the contaminated site. An increase of the enzymatic activity was observed in CAT, GPx, G6PDH and GST in gill and digestive gland, a decreased SOD activity in gill and G6PDH activity in the gland, when applied to the purification treatment. At the site able to cultivation, the activity of enzymes CAT and G6PDH increased after purification and GST activity was reduced. We observed a pattern of decreased rate of transcription genes, *FABP*, and *CYP_{356A1}* and *GSTO* in gill. The results suggest that treatments depuration system can be used as supplementary detoxification of xenobiotics and microorganisms present in the cultivation areas of aquatics organisms, because they act minimizing the oxidative stress caused by pollutants and pathogens.

Keywords: molluscs, domestic sewage, ultraviolet, gene expression, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da Ostra-do-pacífico, <i>Crassostrea gigas</i>	27
Figura 2. Formação de radicais livres e danos ao DNA	31
Figura 3. Atividade antioxidantes das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GST e G6PDH.....	32
Figura 4. Radiação UV no espectro magnético	39
Figura 5. Mapa de localização dos pontos de exposição das ostras <i>C. giga</i>	46
Figura 6. Esquema de recirculação de água no tanque de depuração....	47
Figura 7. Amplificação dos genes glutathione S-Transferase ômega (<i>GSTO</i>), proteína ligante a ácidos graxos (<i>FABP</i>), citocromo P450 356A1 (<i>CYP_{356A1}</i>) e gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (<i>GAPDH</i>) em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	49
Figura 8. Transcrição dos genes proteína ligante de ácidos graxos (<i>FABP</i>), citocromo P450 (<i>CYP_{356A1}</i>) e glutathione S-transferase classe ômega (<i>GSTO</i>) por RT-PCR em brânquia de ostras coletadas do local 1, Ribeirão da Ilha	54
Figura 9. Transcrição dos genes da proteína ligante de ácidos graxos (<i>FABP</i>), citocromo P450 (<i>CYP_{356A1}</i>) e glutathione S-transferase classe ômega (<i>GSTO</i>) por RT-PCR em brânquia de ostras coletadas do local 2, Rio Bucheler	55
Figura 10. Análise densitométrica para avaliação da expressão da proteína <i>CYP_{356A1}</i>	56
Figura 11. Atividade enzimática em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>C. gigas</i> coletadas no local 1, Ribeirão da Ilha.....	58
Figura 12. Atividade enzimática em brânquia e glândula digestiva de ostras <i>C. gigas</i> coletadas no local 2, Rio Bucheler	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Percentual de domicílios atendidos por rede geral de esgoto, em ordem decrescente, segundo as Unidades de Federação - 2008.....	24
Quadro 2. Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2010.....	28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Municípios com serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição, segundo as Grandes Regiões – 1989/2008 24
- Tabela 2. Esquema do delineamento experimental utilizado para a coleta dos tecidos de *C. gigas* para as devidas análises subsequentes 47
- Tabela 3. Tabela demonstrativa da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutathione S-transferase (GST), nos tecidos de brânquia e glândula digestiva de ostras oriundas do local 1 (Ribeirão da Ilha) 60
- Tabela 4. Tabela demonstrativa da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutathione S-transferase (GST), nos tecidos de brânquia e glândula digestiva de ostras oriundas do local 2 (Rio Bucheler), 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT - Actina
BR – Brânquia
CASAN - Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CAT - Catalase
COMCAP - Companhia Melhoramentos da Capital
CYP₄₅₀ – Citocromo P₄₅₀
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
ERONs – Espécies Reativas de Nitrogênio
FABP – Proteína ligante de ácidos graxos e compostos lipofílicos
GD – Glândula digestiva
GPx – Glutathione Peroxidase
GR – Glutathione Redutase
GSH – Glutathione Reduzida
GSSG – Glutathione Dissulfeto
GST – Glutathione S-transferase
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G6PDH – Glicose 6-Fosfato Desidrogenase
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICES – Conselho Internacional para a Exploração do Mar
LABCAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LVA – Laboratório de Virologia Aplicada
ONU – Organização das Nações Unidas
MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOFM – Monooxidases De Função Mista
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NO[·] - Óxido Nítrico
O₂^{·-} - Ânion Superóxido
[·]OH - Radical Hidroxila
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SOD – Superóxido Dismutase
T₀ – tempo zero (controle)
T₂₄ – 24 horas após exposição aos tratamentos de depuração
T₇ – 7 dias após exposição aos tratamentos de depuração
UV – Ultravioleta
28 S – Gene ribossomal 28 S

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 ÁGUA E SANEAMENTO.....	23
1.2 IMPACTOS AMBIENTAIS POR ESGOTO SANITÁRIO.....	25
1.3 MOLUSCOS BIVALVES: ATIVIDADE ECONÔMICA.....	26
1.4 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	29
1.4.1 Enzimas antioxidantes.....	30
1.4.2 Biotransformação.....	33
1.4.3 Fase I: <i>Citocromo P450</i>	34
1.4.4 Fase II: <i>GSTO</i>	36
1.4.5 <i>FABP</i>	37
1.5 DESINFECÇÃO ULTRAVIOLETA.....	37
1.5.1 Depuração de moluscos.....	38
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.1.1 Objetivos Específicos.....	40
2.1.2 Revista escolhida para submissão do artigo científico.....	41
3 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES E RESPOSTAS ENZIMÁTICAS EM OSTRA DO PACÍFICO <i>Crassostrea gigas</i> (THUNBERG 1793) EXPOSTAS A EFLUENTES DOMÉSTICOS E DEPURADAS.....	42
3.1 RESUMO.....	42
3.2 INTRODUÇÃO.....	43
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.3.1 Desenho experimental e coleta dos animais.....	45
3.3.2 Preparação e padronização das amostras para análise molecular.....	48
3.3.3 Preparação e padronização das amostras para análise da proteína CYP ₃₅₆ A ₁ através de anticorpos policlonais.....	41
3.3.4 Preparação e padronização das amostras para análise da atividade enzimática.....	42
3.3.5 Análise Estatística.....	52
3.4 RESULTADOS.....	52
3.4.1 Transcrição de genes.....	52
3.4.2 Expressão da proteína CYP ₃₅₆ A ₁	53
3.4.3 Atividade enzimática.....	53

3.4.3.1 Catalase (CAT)	53
3.4.3.2 Glutathiona S-Transferase (GST)	56
3.4.3.3 Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	57
3.4.3.4 Glutathiona Peroxidase (GPx).	57
3.4.3.5 Glutathiona Redutase (GR).....	57
3.4.3.6 Superóxido Dismutase (SOD).....	57
3.5 DISCUSSÃO.....	61
3.5.1 Transcrição de genes <i>CYP_{356A1}</i> , <i>FABP</i> e <i>GSTO</i>	62
3.5.2 Expressão da proteína <i>CYP_{356A1}</i>	63
3.5.3 Atividade enzimática	64
3.6 CONCLUSÕES	66
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO.....	66
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	72
ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁGUA E SANEAMENTO BÁSICO

A água é um bem essencial aos seres vivos e ao desenvolvimento da humanidade. Embora esteja presente em 71% do ambiente, é um recurso não renovável, que se constitui em um fator extremamente preocupante.

Dados utilizados pela mídia mundial demonstram que de toda a água disponível na terra, 97,6% está presente nos oceanos, sendo que a água doce corresponde aos 2,4% restantes. Destes, apenas 0,31% não está concentrada nos pólos na forma de gelo e menos de 0,02% está disponível em rios e lagos, já que grande parte se concentra em locais inacessíveis (JACOBI, 2011).

Contudo, o Brasil ocupa uma posição privilegiada em relação à disponibilidade de recursos hídricos. No mundo, 1,2 bilhão de pessoas não têm acesso a água potável e cerca de 5 milhões morrem a cada ano por doenças relacionadas à falta de abastecimento. Já o Brasil conta com 12% dos recursos hídricos do planeta, por isso o volume distribuído por pessoa é 19 vezes superior ao mínimo estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU, 2005) – de $1.700 \text{ m}^3/\text{s}$ por habitante/ano. No entanto, esse recurso vital não chega para todos os brasileiros na mesma quantidade e regularidade (BRASIL, 2010).

Segundo o IBGE (2011), 33 municípios ainda não dispunham de rede de distribuição de água no ano de 2008, número que veio diminuindo no decorrer dos anos como podemos visualizar na tabela 1. Além disso, do total de municípios brasileiros, 826 eram abastecidos por vias alternativas, como exploração de águas subterrâneas através de poços e ponteiros, cisternas, caminhão pipa, entre outros.

Outra questão preocupante gira em torno do tratamento dado às águas no Brasil. Apenas 87,2% dos municípios recebem água tratada, 6,2% recebem parcialmente tratada e 6,6% recebem água sem qualquer tratamento. A rede coletora de esgoto também encontra-se defasada; somente 55,2% dos municípios brasileiros possuem o serviço, e muitos contam somente com tratamento parcial do esgoto (IBGE, 2008). No quadro 1 podemos observar o percentual de domicílios atendidos por rede geral de esgoto em todo o País.

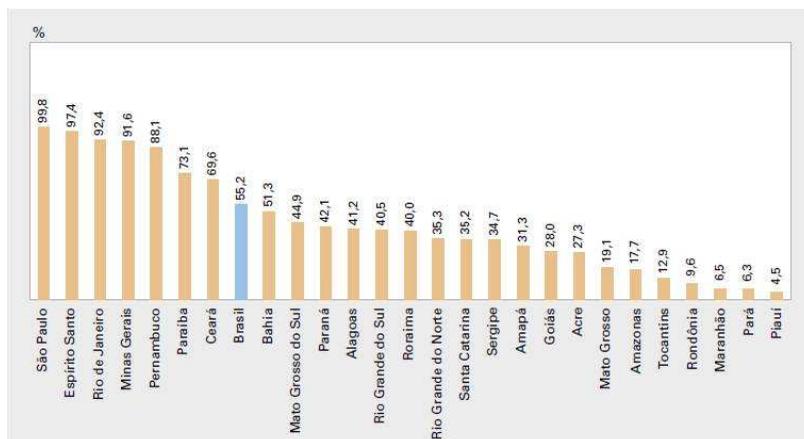
Grandes Regiões	Municípios com serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição, segundo as Grandes Regiões – 1989/2008					
	1989		2000		2008	
	Quantidade	Percentual (%)	Quantidade	Percentual (%)	Quantidade	Percentual (%)
Brasil	4245	95,9	5391	97,9	5531	99,4
Norte	259	86,9	422	94	442	98,4
Nordeste	1371	93,8	1722	96,4	1772	98,8
Sudeste	1429	99,9	1666	100	1668	100
Sul	834	97,3	1142	98,5	1185	99,7
Centro-Oeste	352	92,9	439	98,4	464	99,6

Tabela 1- Municípios com serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição, segundo as Grandes Regiões – 1989/2008.

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2008.

Notas: 1. Considera-se o município em que pelo menos um distrito (mesmo que apenas parte dele) seja abastecido por rede geral de distribuição de água.

2. O total de municípios era de 4425, de 5507 e 5564, em 1989, 2000 e 2008, respectivamente.



Quadro 1. Percentual de domicílios atendidos por rede geral de esgoto, em ordem decrescente, segundo as Unidades de Federação - 2008. Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2008.

O saneamento básico é de fundamental importância para a sanidade da população. Sua ausência provoca a poluição dos recursos hídricos, aumenta o número de enfermidades e causa prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente.

Atualmente, a capital do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, é atendida pela concessionária CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento), porém 66% da população ainda não possui sistema de tratamento, projetando um déficit bastante grande e comprometendo diferentes atividades econômicas, tais como o turismo e a maricultura.

Os resíduos sólidos também geram um forte impacto negativo ao ambiente se não destinados adequadamente. Os serviços de manejo destes resíduos compreendem um conjunto de atividades, infraestrutura e instalações operacionais de coleta, transporte, transbordo, tratamento e destino final do lixo doméstico e do lixo originário da varrição e limpeza de logradouros e vias públicas.

Santa Catarina possui 2,7% dos resíduos sólidos descartados em lixões e 87,2% em aterros sanitários controlados. O serviço de coleta de lixo é realizado pela Companhia Melhoramentos da Capital - COMCAP (PMF, 2008).

1.2 IMPACTOS AMBIENTAIS POR ESGOTO DOMÉSTICO

O Brasil possui uma faixa litorânea com aproximadamente 8,5 mil quilômetros de extensão, onde se encontra praticamente 25% da população do País, ou seja, 47,5 milhões de pessoas (IBGE, 2011). Os 400 municípios costeiros possuem em média 90 hab/Km², valor muito superior à média nacional (19 hab/Km²) e somente 3 das 17 capitais dos Estados litorâneos não se localizam à beira-mar (SERAFIM; HAZIN, 2006).

O constante crescimento da população exerce uma pressão extremamente grande nas áreas costeiras, em consequência de atividades industriais, pesca, turismo e lazer, principalmente no verão onde o aumento do número de pessoas é consideravelmente maior devido ao movimento nas praias (BRAGA *et. al.*, 2000).

Os efluentes domésticos e industriais lançados nos oceanos são um dos fatores mais preocupantes atualmente, pois causam a contaminação de lençóis freáticos e aquíferos, dificultam a navegação devido ao crescimento de macrófitas aquáticas pelo excesso de nutrientes (BRAGA *et al.*, 2000), impossibilitam a recreação pela

grande quantidade de microrganismos e compostos químicos presentes, comprometem a apreciação visual e estética devido a materiais flutuantes e odor desagradável (DEPLEDGE, 1993), geram o desequilíbrio do meio ambiente pela falta de oxigenação e falta de radiação, podendo causar mortalidades.

Segundo Pereira (2004), os principais poluentes aquáticos são os poluentes químicos biodegradáveis (gorduras, carboidratos, proteína) e persistentes (detergentes sintéticos, inseticidas, fertilizantes, hidrocarbonetos, metais); poluentes físicos térmicos, provenientes da água aquecida usada no processo de refrigeração de refinarias, siderúrgicas e usinas termoelétricas e poluentes físicos por resíduos sólidos (sólidos suspensos, coloidais ou dissolvidos) provenientes de esgotos industriais e domésticos e da erosão de solos; e poluentes biológicos bacterianos, virais, por protozoários e vermes; todos provenientes do esgoto.

Podemos dizer então, que o esgoto é um coquetel de nutrientes, compostos orgânicos, metais, medicamentos, produtos de higiene pessoal (BOLONG *et al.*, 2009), patógenos, detergentes, gorduras, coliformes fecais, pesticidas, fertilizantes; além de muitos outros contaminantes desconhecidos que podem causar efeitos tóxicos diferenciados ao ecossistema marinho e aos humanos (AVERY *et al.*, 1998).

Os poluentes não só afetam a sobrevivência e o desempenho dos organismos como também causam o estresse do ecossistema como um todo, modificando sua estrutura, funções e diversidade em vários níveis de organização, incluindo o número de espécies e sua estrutura genética (BAREA & PUEYO, 1998). Muitos dos poluentes lançados nos rios e oceanos são cancerígenos e causadores de mutações genéticas, e podem afetar o metabolismo dos animais de tal maneira, provocando a morte dos mesmos (OHE *et al.*, 2004).

1.3 MOLUSCOS BIVALVES: ATIVIDADE ECONÔMICA

A aquicultura é uma das atividades econômicas que mais têm se desenvolvido no Brasil; principalmente a mitilicultura e ostreicultura. O litoral de Santa Catarina apresenta grande potencial para o desenvolvimento desta atividade, o que confere ao Estado o título de maior produtor de moluscos do país, respondendo por cerca de 90% da produção nacional (EPAGRI, 2010).

O cultivo de moluscos teve início com a idéia da ampliação da

renda familiar de pescadores artesanais, porém, com o passar dos anos e o aprimoramento das técnicas de cultivo e processamento, tornou-se a principal fonte de renda das comunidades, alterando o status do setor de artesanal para micro empresarial, promovendo a economia local.

As espécies mais cultivadas em Santa Catarina são a ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) e o mexilhão, *Perna perna*. O cultivo de pectinídeos é bastante recente, com uma produção ainda pequena de vieiras, *Nodipecten nodosus*, porém bastante promissora (POLI *et al.*, 2004; RUPP & DE BEM, 2004).

A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (Figura 1) é taxonomicamente classificada de acordo com a seguinte hierarquia:

Reino – Animalia

Filo – Mollusca

Classe – Bivalvia (LINNAEUS 1758)

Subclasse – Pterimorfia (BEURLEN 1994)

Ordem – Ostreoida

Família – Ostreidae (RAFINESQUE 1815)

Genêro – *Crassostrea* (SACCO 1897)

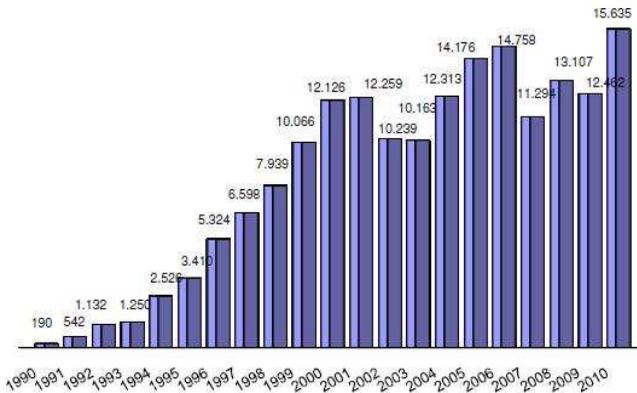
Espécie – *Crassostrea gigas* (THUNBERG 1793)



Figura 1. Ilustração da Ostra-do-pacífico, *Crassostrea gigas*.

Ao longo de 20 anos (1990-2010) a produção de moluscos apresentou um aumento progressivo. Em 2010, a produção total foi de

15.635 toneladas, onde o cultivo de mexilhões representou a maior porção desta produção total (13.722 toneladas) e o cultivo de ostras alcançou o segundo lugar, com 1.908 toneladas. A produção de moluscos teve um crescimento de 25,5% comparado ao ano de 2009, atingindo um recorde de produção no Estado, como mostra o quadro 2.



Quadro 2. Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2010. As unidades do gráfico

correspondem a toneladas por ano. Fonte: EPAGRI, 2010. Síntese Informativa da Maricultura.

Porém, alguns fatores ambientais adversos frequentemente prejudicam a qualidade e o cultivo dos organismos cultivados, como período de chuvas, temperaturas elevadas, maré vermelha, que alteram o meio ambiente, prejudicam a produção, podem causar a mortalidade dos animais e também provocar doenças infecciosas nos seres humanos. Este é, sem dúvida, o fator que mais afeta o crescimento da atividade - o risco de contração de doenças provocadas pelo consumo de moluscos contaminados. Nos Estados Unidos, as doenças de origem alimentar são responsáveis por 76 milhões de casos por ano e o consumo de moluscos bivalves e outros frutos do mar estão envolvidos em 10 a 19% destes (BUTT *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2011).

Nos últimos anos foi detectado um aumento da poluição por esgotos domésticos e industriais em certas áreas de cultivo na região da Grande Florianópolis. Foi verificada a presença de patógenos virais e

bacterianos e de poluentes orgânicos e inorgânicos, tanto na água quanto nos organismos cultivados (RIGOTTO *et al.*, 2005). Esta ocorrência preocupa tanto as empresas produtoras quanto os consumidores finais, principalmente quando o consumo é *in natura*. Com isto, em 2005 foi fundado o Comitê Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves, criado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com a finalidade de estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantir a qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves visando à proteção da saúde da população e a criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional (MPA, 2011).

1.4 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Na busca por métodos e resultados mais precisos na avaliação dos efeitos das ações antrópicas, o Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES) recomenda que programas de biomonitoramento ambiental sejam realizados para a prevenção de impactos irreversíveis nos ecossistemas. Nestes programas são utilizados organismos bioindicadores e biomonitores de contaminação (ICES, 2004).

Os organismos bioindicadores indicam efeito ecológico e estão presentes ou ausentes em determinadas áreas, já os biomonitores são utilizados para quantificar a presença de contaminantes no ambiente, através da bioacumulação destes em seus tecidos. A presença de um contaminante não necessariamente sugere que o mesmo cause um efeito tóxico para o organismo biomonitor, portanto, é necessária a avaliação dos efeitos no organismo através do seu monitoramento (PHILLIPS & RAINBOW, 1993).

Os contaminantes exercem um efeito biológico no meio ambiente que se traduz em respostas fisiológicas no organismo (DEPLEDGE, 1993). Estas respostas são chamadas de biomarcadores, que agem como sinalizadores da degradação ambiental causada por agentes tóxicos (RAND, 1995) e assim, podem ser considerados indicadores precoces de contaminação (WALKER *et al.*, 1996).

As ferramentas genômicas estão sendo empregadas também na análise ecotoxicológica, que explicam os efeitos moleculares e celulares dos contaminantes através das alterações na expressão gênica dos organismos. Algumas das técnicas são: extração RNA total, purificação

do RNA mensageiro, hibridização subtrativa supressiva, clonagem, sequenciamento de genes.

Por estes motivos, o uso de biomarcadores está sendo incorporado em programas de biomonitoramento em diversos países da Europa, nos Estados Unidos e Brasil (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; RECOS, 2003). Dentre os biomarcadores, também estão as enzimas relacionadas com as defesas antioxidantes e de biotransformação de xenobióticos (BURGEOT *et al.*, 1996).

Em moluscos, os tecidos normalmente analisados para estudo com biomarcadores são as brânquias e a glândula digestiva, por serem órgãos relacionados com a fisiologia alimentar, obtenção do alimento, trocas gasosas, digestão, absorção, biotransformação e excreção (WILDISH & KTISTMANSON, 1997; SQUELLA, 2008). As brânquias são órgãos que estão diretamente em contato com a água e este tecido é bastante utilizado em trabalhos de toxicologia, pois é o primeiro contato que o animal tem com os contaminantes. Posteriormente estes contaminantes são transportados para outros tecidos, principalmente para a glândula digestiva, órgão envolvido na biotransformação e detoxificação destas substâncias (CASTELLVÍ-PIULACHS, 1972; SQUELLA, 2008).

Além de ser responsável pelo processamento dos alimentos, a glândula digestiva pode acumular grande quantidade de poluentes assim como a brânquia. Porém, na brânquia a quantidade geralmente é menor, já que os xenobióticos são mais rapidamente eliminados devido ao contato direto com a água, capacidade de filtração, eliminação pré-sistêmica, que direciona os poluentes para outros tecidos ou são eliminados antes de serem absorvidos (SALÁNKI *et al.*, 2002).

1.4.1 Enzimas antioxidantes

Radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula capaz de existir independentemente e que possua ao menos um elétron desemparelhado na última camada orbital atômica ou molecular, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), óxido nítrico (NO^{\cdot}), entre outros. São altamente reativos e podem danificar as células corporais. São produzidos continuamente como subproduto do metabolismo ou pela respiração mitocondrial (ZWART *et al.*, 1999).

Outros compostos igualmente reativos são classificados como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERONS), porém não possuem elétrons desemparelhados em sua última

camada orbital. Estes, além de serem produzidos pela cadeia respiratória mitocondrial e durante a biotransformação de xenobióticos (REGOLI *et al.*, 2002), podem ser gerados após exposição à radiação UV-A e UV-B (ROWE *et al.*, 2008), no processo de fagocitose (BABIOR, 2004), quando em contato com xenobióticos (TIMBRELL, 1991; LIVINGSTONE, 1998), causando danos celulares (Figura 2).

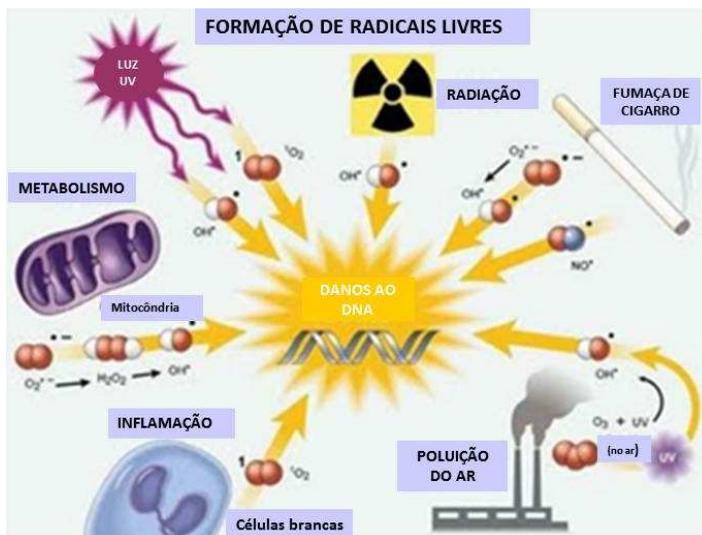


Figura 2. Formação de radicais livres e danos ao DNA.

Fonte: Modificado de <http://viticodevagamundo.blogspot.com/2010/03/radical-livre-quimica biologica.html>

Ao mesmo tempo em que o organismo produz radicais livres, EROs e ERONs, mecanismos de ação antioxidante atuam na proteção celular, formando o sistema de defesa antioxidante. Este sistema de defesa é formado por enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) (Figura 3) e numerosos antioxidantes não enzimáticos como vitaminas A, E e C, glutatona, ubiquinona e flavonóides (BRAY & LEVY, 2000; URSO, 2003). O equilíbrio entre as três principais enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT e GPx) é muito importante para a remoção de intermediários tóxicos.

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

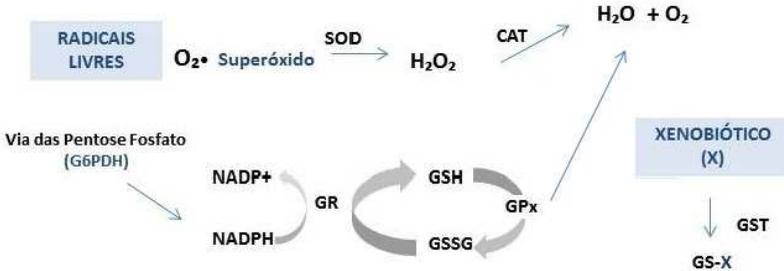
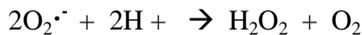


Figura 3. Atividade antioxidantes das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GST e G6PDH. Fonte: Adaptado de Zanette (2003).

A superóxido dismutase foi responsável pela definição da teoria da toxicidades do oxigênio. A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical O₂•⁻ dismutando-o a H₂O₂ e protegendo em até 97% os alvos do ataque do ânion superóxido. Possui diferentes formas, como a Mn-SOD presente na mitocôndria e a Cu/Zn-SOD presente no citosol, em eucariotos (FRIDOVICH, 1995; HALLIWELL *et al.*, 2007).

Nas reações catalisadas pela SOD, duas moléculas do ânion superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (McCORD & FRIDOVICH, 1969; NORDBERG & ARNER, 2001), como podemos visualizar na reação abaixo:



Para a eliminação dos peróxidos de hidrogênio formados, existem duas enzimas principais: a CAT e a GPx. A CAT é uma enzima peroxissomal que faz parte do grupo de heme-proteínas, catalisa a reação de decomposição do H₂O₂ a água e oxigênio, a partir de um mecanismo que envolve dois estágios em que o peróxido de hidrogênio, alternadamente, oxida e reduz o ferro no sítio ativo da enzima. Algumas destas enzimas possuem NADPH como coenzima, que tem a função de

evitar a formação de um composto inativo e de tornar a catalase mais eficiente (BICOUT *et al.*, 1995).

A glutationa peroxidase (GPx) possui a função de decompor peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a água, através da oxidação da GSH. Processos oxidativos celulares e a atividade da GPx geram o dissulfeto glutationa ou glutationa oxidada (GSSG). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutationa redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. A GR é uma proteína composta de duas subunidades, cada uma contendo uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo. O FAD recebe elétrons do NADPH, passando os elétrons em seguida para a ponte dissulfeto no sítio ativo. Os grupos SH formados dentro do sítio ativo interagem com a GSSG, reduzindo-a a GSH e a ponte dissulfeto é refeita dentro do sítio ativo da GR (BERKHOLZ *et al.*, 2008).

A glicose 6-fosfato desidrogenase é a enzima responsável em reduzir NADP^+ em NADPH para ser utilizado pela GR para regeneração de GSSG. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da glutationa também fica afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante coadjuvante (SLEKAR *et al.*, 1996).

A enzima glutationa S-transferase (GST) é uma enzima citosólica e também encontrada na fração microsossomal, que catalisa reações de conjugação de contaminantes ou seus metabólitos com a GSH, sendo muito importante nos mecanismos de detoxificação de xenobióticos.

As enzimas antioxidantes têm papel fundamental nas análises ecotoxicológicas, pois conseguem expressar o grau de contaminação de determinados ambientes e organismos. A indução destas enzimas pode ocorrer pelo aumento da produção de EROs/ERONs, de forma que estas tenham que agir para combater os efeitos deletérios das espécies reativas; já a inibição enzimática pode estar relacionada com compostos inibidores ou em função de ambientes muito contaminados, onde a defesa enzimática entra em desequilíbrio, causando danos ao organismo (ALMEIDA, 2003).

1.4.2 Biotransformação

O metabolismo de xenobióticos vem sendo estudado amplamente em animais de origem marinha. Várias enzimas de

biotransformação já foram identificadas, principalmente as monooxigenases de função mista (MOFM), que inclui o citocromo P₄₅₀, citocromo b₅ e NADPH citocromo P₄₅₀ redutase. Estas, geralmente são encontradas em diversos tecidos e em maiores concentrações no fígado dos vertebrados, e em órgãos semelhantes em invertebrados, como a glândula digestiva, no caso dos moluscos.

A principal resposta do organismo perante um contaminante é a detoxificação, que visa transformar o xenobiótico do estado ativo para o estado inativo, facilitando sua eliminação. Esta via metabólica emprega uma grande variedade de enzimas e é normalmente dividida em duas ou três fases, conhecidas como fase I (ou de reações funcionais) e fase II (ou de reações conjugativas) (PETUSHOK *et al.*, 2002). Já a fase III é conhecida como as vias de transporte e excreção dos metabólitos conjugados (LUEDEKING & KOEHLER, 2004), embora alguns compostos sofram apenas um tipo de biotransformação. O organismo também utiliza um sistema chamado de eliminação pré-sistêmica ou efeito de primeira passagem, que é capaz de metabolizar grande parte da “dose” administrada, antes que atinja a circulação sanguínea.

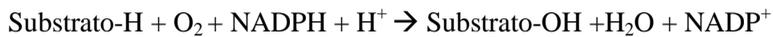
As reações da fase I compreendem reações de hidrólise, redução e oxidação, onde grupos funcionais específicos são adicionados ou expostos (-OH, -NH₂, -SH, -COOH). Estas reações transformam os xenobióticos lipofílicos em metabólitos mais polares, hidrofílicos, que podem ser excretados diretamente, ou em moléculas quimicamente mais reativas servindo de substratos para as enzimas da fase II, que englobam reações de biossíntese (MUNRO, 2007; LUEDEKING & KOEHLER, A., 2004). Porém, em alguns casos, as reações de detoxificação de xenobióticos podem resultar em espécies mais reativas, aumentando as EROs/ERONs, deixando o animal mais susceptível a danos causados pelo estresse oxidativo. As reações de fase III envolvem proteínas da membrana, identificadas por sua resistência a multidrogas ou multixenobióticos, ou proteínas ligantes de ácidos graxos e compostos lipofílicos (FABP), os quais bombeiam e eliminam as substâncias tóxicas do organismo.

1.4.3 Fase I: Citocromo P450

O citocromo P₄₅₀ (CYP₄₅₀) se caracteriza como uma das maiores famílias de hemoproteínas com funcionalidade diversificada, presente em várias espécies, desde bactérias até humanos, com diversas isoformas que estão ligadas ao retículo endoplasmático e a membrana

mitocondrial (SNYDER, 1998). As proteínas citocromo P₄₅₀ possuem diferentes funções e são separadas por famílias, porém a identidade entre os CYPs de uma mesma família é relativamente baixa, (10-30%), e conseqüentemente, a correlação estrutura-função ainda não está totalmente clara. Algumas famílias são responsáveis pela biotransformação de xenobióticos, outras têm papel importante no metabolismo de esteróides, eicosanóides e ferormônios. Também participam de processos de homeostase e estresse oxidativo, e ainda existem muitas isoformas cujo papel biológico não foi identificado (REWITZ *et al.*, 2006; STEGEMAN & HAHN, 1994).

A nomenclatura designada ao CYP₄₅₀ é proveniente do pico de absorvância que atinge (450 nm) quando reduzido e complexado com monóxido de carbono, e seu papel nas reações de fase I de biotransformação é extremamente importante, pois é parte integrante do sistema monooxigenase dependente, também chamada de oxidase de função mista. Este sistema necessita da transferência de elétrons provenientes da flavoenzima NADPH citocromo P₄₅₀ redutase, ocorrendo da seguinte forma:



A origem do termo monooxigenase é proveniente da incorporação de um átomo de oxigênio ao substrato, e o termo oxidase de função mista se refere à oxidação do substrato e à redução de um átomo de oxigênio a água (BETHIZY & HAYES, 2004; SIMON-GIAVAROTTI, 2001).

Existem algumas técnicas empregadas para determinar funções específicas para as proteínas CYP₄₅₀ e de modo geral, com a evolução da genômica, houve um maior interesse em classificá-las através das análises de sequências; porém, devido a características catalíticas, os CYP₄₅₀, mesmo aqueles evolutivamente distantes (com menos de 40% de identidade na estrutura primária), contêm partes conservadas que determinam um limite mínimo de identidade/similaridade entre as diferentes sequências (HASEMANN, 1995).

Rewitz *et al.* (2006), propõe a imunodeteção como técnica para monitoramento ambiental de organismos expostos à contaminantes. Estes estudos vêm sendo utilizados em invertebrados através de anticorpos heterólogos (que reagem contra proteínas P₄₅₀ de outros organismos, geralmente um vertebrado). Edwards *et al.* (1998) mostram que a mensuração do nível de proteínas CYP₄₅₀ via reação com

anticorpos é uma alternativa para a identificação da atividade biológica de CYP₄₅₀ que catalisam reações desconhecidas.

Uma nova subfamília de CYP foi caracterizada em *C. gigas*, segundo Toledo-Silva (2008), chamada de CYP_{356A1} e demonstrou uma estreita relação com as subfamílias CYP₁ e CYP₂, que estão associados com processos de biotransformação de xenobióticos, e CYP₁₇ que está relacionado com o metabolismo de esteróides. Os resultados foram obtidos através de sequenciamento e clonagem e sugerem que esta nova subfamília CYP_{356A1} possa vir a ser um novo biomarcador de contaminação por esgoto doméstico em *C. gigas*.

Um estudo recente feito por Silva (2010), no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – LABCAI – UFSC, utilizou a expressão heteróloga com o intuito de produzir anticorpos policlonais para o desenvolvimento de uma nova estratégia de avaliação da contaminação ambiental, obtendo resultado satisfatório ao caracterizar uma indução na expressão das proteínas CYP_{356A1} em organismos expostos ao esgoto doméstico não tratado.

1.4.4 Fase II: *GSTO*

As enzimas de fase II catalisam a conjugação de xenobióticos eletrofílicos, como herbicidas, inseticidas, carcinogênicos químicos e outros poluentes, sendo que a enzima glutationa S-transferase (GST) desempenha papel fundamental nas reações desta fase. O nível de expressão e indução desta enzima é considerado um fator crucial na determinação da sensibilidade celular quando exposta a componentes tóxicos. Estão presentes principalmente na parte citosólica e também microsomal. (GADAGBUI & JAMES, 2000).

Baseado em características específicas como a sequência de aminoácidos terminais, reatividade de anticorpos, substratos específicos e sensibilidade a inibidores, as GSTs foram classificadas e nomeadas por alpha, beta, delta, mu, ômega, pi, sigma, tau, theta e zeta (BLANCHETTE *et al.*, 2007). A GST ômega (*GSTO*) tem sido avaliada em estudos realizados com ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) quando expostas a hidrocarbonetos (BOUTET *et al.*, 2004), e esgoto doméstico (MEDEIROS *et al.*, 2008). Esta isoforma sugere o envolvimento no sistema de defesa antioxidante dos organismos, transformação de compostos carcinogênicos e drogas terapêuticas (REYES & ZAKHARYAN, 2006).

As respostas enzimáticas da fase II geralmente são menores do que as do sistema citocromo P₄₅₀, porém as induções causadas nestas fases classificam o CYP₄₅₀ e a GST como biomarcadores de impacto de poluição orgânica, mesmo que em alguns estudos os resultados não tenham sido tão conclusivos quanto o esperado, obtendo-se em alguns casos a indução, em outros a inibição ou até mesmo não apresentando alterações nos níveis de GST (PETUSHOK, 2002).

1.4.5 FABP

As proteínas ligantes de ácidos graxos e compostos lipofílicos (FABP) são pequenas proteínas citosólicas (14-15 kDa) que se ligam não-covalentemente a ligantes hidrofóbicos, principalmente ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (ESTEVES & EHLRICH, 2006). Esta proteína desempenha papel funcional no transporte intracelular e metabolismo de lipídeos. As FABPs transportam uma variedade de compostos hidrofóbicos desde os ácidos graxos, moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais (STORCH & THUMSER, 2000; ESTEVES & EHLRICH, 2006).

1.5 DESINFECÇÃO ULTRAVIOLETA

A desinfecção das águas residuais vem sendo empregada e enfatizada nos últimos anos devido ao aparecimento de patógenos resistentes ao tratamento convencional aplicado, o que representa um risco considerável para a saúde humana. A técnica de desinfecção foi descoberta no ano de 1910, após o desenvolvimento da lâmpada de vapor de mercúrio e o tubo de quartzo, e estabelecer o efeito germicida da irradiação UV.

Porém, a continuidade da aplicação da técnica com radiação ultravioleta foi afetada pelos altos custos, baixa confiabilidade nos equipamentos, dificuldades na manutenção e pelos adventos do uso da cloração e ozonização que eram consideradas técnicas de baixo custo e maior confiabilidade. Esta idéia foi sendo modificada a partir do momento que estudos demonstraram a formação de subprodutos tóxicos durante a cloração e ozonização, tornando a irradiação UV um alvo a ser repensado. Atualmente foi reconhecido que a irradiação UV é bastante eficaz contra bactérias, patógenos, protozoários e vírus que podem ser

transmitidos através da água potável. No entanto, estudos recentes demonstram que as bactérias possuem alguns mecanismos para sobrevivência mesmo após a exposição à UV, dependendo do grau de intensidade e tempo, sendo que danos ao DNA podem ser reparados, e assim podem recuperar sua replicabilidade (SÜB *et al.*, 2009).

Além de ser eficiente contra patógenos, a produção de subprodutos é muito baixa ou quase nula em lâmpadas UV de baixa pressão e a estabilidade da água não é afetada. (WOLFE, 1990; HIJNEN *et al.*, 2006).

A radiação UV é a região do espectro magnético que se situa entre os raios-X e a luz visível. O espectro da radiação UV é dividido em quatro regiões: UV de vácuo (100-200nm), UV-C (200-280nm), UV-B (280-315nm) e UV-A (315-40nm) (Figura 4). A desinfecção ocorre principalmente devido a ação germicida da radiação UV-B e UV-C sobre os organismos. A ação germicida da radiação UV-A é menor ao ser comparada a UV-B e UV-C, requerendo um tempo muito maior de exposição caso se utilize a radiação UV-A para desinfecção.

A faixa de radiação UV de 254nm danificam os ácidos nucleicos, impedindo a replicação do DNA. A absorção da UV pelos nucleotídeos ocorre entre a faixa de 200-300nm, sendo afetada pela composição do DNA ou RNA e é cumulativa. Purinas e pirimidinas absorvem fortemente a radiação UV, porém a taxa de dano de UV induzido é maior nas pirimidinas.

1.5.1 Depuração de moluscos

A técnica de depuração de moluscos bivalves, especialmente da espécie *Crassostrea gigas*, no Brasil, vem sendo utilizada recentemente visto que estes organismos são filtradores e podem concentrar grandes quantidades de poluentes e patógenos em seus tecidos.

Porém, no Brasil ainda não há legislação para a utilização da depuração. Há menção de depuração na Minuta de Instrução Normativa Interministerial relativa à Portaria nº 122, de 03 de maio de 2011, publicada na seção 1 do Diário Oficial da União em 04 de maio de 2011, que institui o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), porém, este documento já sofreu uma série de modificações e ainda não entrou em vigor.

Nos casos onde a depuração de moluscos é realizada através da transposição, acondicionando os animais em locais próprios após serem coletados do mar, e assim, por filtração natural, ocorrer a

descontaminação dos poluentes; e também feita com o auxílio de radiação UV.

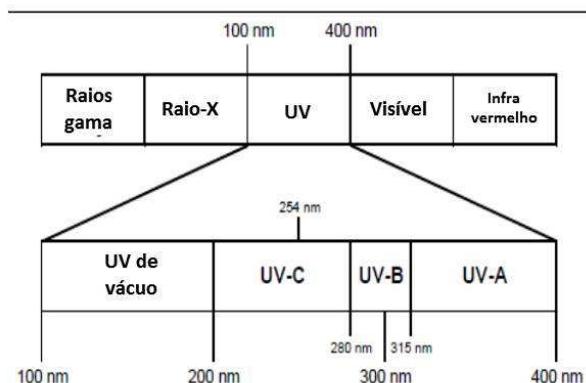


Figura 4. Radiação UV no espectro magnético. Fonte: EPA, 2006

O risco de ocorrência de doenças infecciosas provenientes do consumo de moluscos bivalves já é reconhecido pelas agências nacionais de saúde e pela indústria produtora, e também é consenso na comunidade científica que animais provenientes de locais contaminados aumentam grandemente a probabilidade de infectar o consumidor, principalmente se ingeridos crus (LEAL *et al.*, 2011). Deste modo, vários países aderiram a técnica de depuração como obrigatória, porém no Brasil ainda não há legislação específica.

Estudos com moluscos contaminados por vírus, bactérias e protozoários e depurados com radiação UV indicam a redução do número de microrganismos patogênicos, porém sugerem que ainda assim o consumo dos animais crus seja evitado. O tempo de depuração necessário para diminuir a quantidade de diferentes espécies de patógenos ainda é bastante discutido (HIJNEN *et al.*, 2006; LEAL *et al.*, 2011; MUNIAIN-MUJIKI *et al.*, 2002).

Em Santa Catarina, Florianópolis, testes com depuração de *C. gigas* estão sendo realizados em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina, empresa Blue Water Aquaculture Ltda. e restaurantes da região, porém os resultados ainda são preliminares.

Alguns estudos mostram que o uso de radiação UV em tanques depuradores de moluscos para reduzir a contaminação de microrganismos patogênicos pode ser eficiente, porém existem controvérsias. Leal *et al.*, (2011) sugerem que o tratamento com radiação UV é ineficaz na redução de cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, Adenovírus humano, vírus da Hepatite A, Norovírus humano (grupo I e II), Poliomavírus e *Salmonella sp.* Mujika *et al.*, (2002), afirmam que o tratamento com radiação UV, ozônio e filtro biológico é muito eficiente para vírus humanos; assim como Hijnen *et al.*, (2006) afirmam que tratamentos com radiação UV são altamente confiáveis para eliminar todos os tipos de patógenos transmitidos pela água. Porém, cabe ressaltar que estes resultados variam dependendo do sistema de tratamento implantado; intensidade e tempo de exposição à radiação UV; capacidade de recirculação, entre outros. Importante ressaltar também que a quantidade de cópias genômicas virais identificadas por RT-PCR não indica a viabilidade dos vírus, que deve ser confirmada por técnica de cultura celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo a análise bioquímica e molecular de tecidos de ostras *Crassostrea gigas*, verificando a possível utilização das respostas das atividades de enzimas relacionadas à atividade antioxidante, e da transcrição de genes responsáveis pela biotransformação e detoxificação de xenobióticos, como biomarcadores de contaminação aquática após exposição de *C. gigas* à radiação ultravioleta.

2.1.1 Objetivos Específicos

✓ Analisar a atividade das enzimas SOD, CAT, GR, GPx, GST e G6PDH em brânquia (BR) e glândula digestiva (GD) de ostras *C. gigas* provenientes do Ribeirão da Ilha e da foz do Rio Bucheler, em dois diferentes tempos (T_0 – antes da depuração – e T_7 , 7 dias após depuração em tanques com e sem radiação UV).

✓ Analisar a expressão da proteína citocromo P450 (CYP_{356A1}) em microsossomos de BR e GD de ostras provenientes de ambos os locais, em dois diferentes tempos (T_0 – antes da depuração – e T_7 , 7 dias após exposição a ambos tratamentos de depuração).

✓ Avaliar a transcrição dos genes *FABP*, *GSTO* e CYP_{356A1} em amostras de BR e GD das ostras provenientes de ambos os locais, em dois diferentes tempos (T_0 – antes da depuração – e T_{24} , 24 horas após exposição a ambos os tratamentos de depuração).

2.1.2 Revista escolhida para submissão do artigo científico

O trabalho final deverá ser encaminhado para a revista *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Qualis A2 na área de Zootecnia e Recursos Pesqueiros em 2012).

3 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES E RESPOSTAS ENZIMÁTICAS EM OSTRA DO PACÍFICO *Crassostrea gigas* (THUNBERG 1793) EXPOSTAS A AFLUENTES DOMÉSTICOS E DEPURADAS

3.1 RESUMO

Ostras *Crassostrea gigas* foram expostas durante 14 dias em dois locais distintos da região da Grande Florianópolis, SC, Brasil (local contaminado e local apto para o cultivo). Após a exposição, amostras de brânquia e glândula digestiva foram coletadas dos animais no tempo 0 (controle), T₂₄ (24 horas após a exposição dos organismos aos tratamentos de depuração com e sem radiação ultravioleta, para análise da expressão dos genes *CYP_{356A1}*, *GSTO* e *FABP*) e T₇ (7 dias após exposição aos tratamentos de depuração para análise da expressão da proteína *CYP_{356A1}* e atividade enzimática da SOD, CAT, GPx, GR, GST e G6PDH). Enzimas antioxidantes e genes transcritos foram analisados para verificar a possibilidade de utilização destes como biomarcadores de contaminação aquática em *C. gigas* após depuração. As respostas enzimáticas apresentaram maior variação nos tecidos de *C. gigas* provenientes do local contaminado, sofrendo aumento na atividade das enzimas CAT, GPx, G6PDH e GST na brânquia e glândula, e redução da atividade da SOD na brânquia e da atividade da G6PDH na glândula quando aplicado o tratamento de depuração. No local apto para cultivo, a atividade das enzimas CAT e G6PDH aumentaram após depuração e a atividade da GST foi reduzida. Foi observado um padrão de diminuição da taxa de transcrição dos genes, *FABP*, *GSTO* e *CYP_{356A1}* na brânquia destes organismos.

Os resultados sugerem que os tratamentos de depuração podem ser utilizados como sistema complementar de detoxificação dos xenobióticos e microrganismos para organismos presentes em locais de cultivo de ostras *C. gigas*, pois atuam minimizando o estresse oxidativo causado por poluentes e patógenos.

Palavras-chave: moluscos, esgoto doméstico, ultravioleta, expressão de genes, estresse oxidativo.

3.2 INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves são frequentemente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental, pois são filtradores, apresentam ampla distribuição geográfica, não se deslocam voluntariamente e suportam condições entre marés, amplas variações de salinidade e temperatura (salvo pectinídeos) (RUPP & PARSON, 2004; LEE & YOUNGER, 2002); estão presentes em abundância na natureza tanto em mar aberto quanto em estuários e, em muitos casos, são espécies dominantes no seu habitat (SHEEHAN & POWER, 1999).

Também podem ser considerados vetores de disseminação e/ou carreadores de biotoxinas e contaminates, pois acumulam microrganismos como vírus e bactérias, protozoários, metais e outros tipos de poluentes, podendo apresentar um risco significativo à saúde quando consumidos crus ou levemente cozidos (CHIRONNA *et al.*, 2002; MUNIAIN-MUJICA *et al.*, 2002).

Os microrganismos patogênicos marinhos que causam danos à saúde humana pela ingestão de alimentos contaminados são, principalmente, vírus e bactérias. Os vírus e bactérias capazes de persistirem no ambiente incluem, entre outros, os adenovírus, calicivírus, enterovírus e hepatovírus, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*, que usualmente são transmitidos via fecal-oral e replicam-se no trato gastrointestinal do hospedeiro (FONG & LIPP, 2005). Estes vírus podem contaminar os moluscos através da água poluída e também pela higiene inadequada dos manipuladores de alimentos (LEES, 2000).

Os contaminantes exercem um efeito biológico no meio ambiente que se traduz em respostas fisiológicas no organismo (DEPLEDGE, 1993). Estas respostas são chamadas de biomarcadores, que agem como sinalizadores da degradação ambiental causada por agentes tóxicos (RAND, 1995) e assim, podem ser considerados indicadores precoces de contaminação (WALKER *et al.*, 1996).

Por estes motivos, o uso de biomarcadores está sendo incorporado em programas de biomonitoramento em diversos países da Europa, nos Estados Unidos e Brasil (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; RECOS, 2003). Dentre os biomarcadores, também estão as enzimas relacionadas com as defesas antioxidantes e de biotransformação de xenobióticos (BURGEOT *et al.*, 1996).

Ao mesmo tempo em que o organismo produz radicais livres, EROs e ERONs, mecanismos de ação antioxidante atuam na proteção celular, formando o sistema de defesa antioxidante. Este sistema de defesa é formado por enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e numerosos antioxidantes não enzimáticos como vitaminas A, E e C, glutathione, ubiquinona e flavonóides (BRAY & LEVY, 2000; URSO, 2003). O equilíbrio entre as três principais enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT e GPx) é muito importante para a remoção de intermediários tóxicos.

As enzimas antioxidantes têm papel fundamental nas análises ecotoxicológicas, pois conseguem expressar o grau de contaminação de determinados ambientes e organismos. A indução destas enzimas pode ocorrer pelo aumento da produção de EROs/ERONs, de forma que estas tenham que agir para combater os efeitos deletérios das espécies reativas; já a inibição enzimática pode estar relacionada com compostos inibidores ou em função de ambientes muito contaminados, onde a defesa enzimática entra em desequilíbrio, causando danos ao organismo (ALMEIDA, 2003).

Outras enzimas participam da biotransformação de xenobióticos como o citocromo P₄₅₀, citocromo b₅ e NADPH citocromo P₄₅₀ redutase, *GSTO*, *FABP*, entre outras que transformam, conjugam e eliminam os contaminantes do organismo.

Devido ao aumento de poluentes lançados nos efluentes, técnicas de depuração de moluscos estão sendo empregadas obrigatoriamente em alguns países visando a minimização da contração de doenças infecciosas pelos humanos (LEAL *et al.*, 2011).

A ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* é comumente utilizada para fins de estudos bioquímicos e moleculares, pois apresenta características que atendem os requisitos necessários para fins de biomonitoramento, uma vez que é a espécie de molusco mais cultivada e estudada no mundo (FAO, 2006; SAAVEDRA & BACHERE, 2006). Esta espécie possui um amplo número de genes já identificados, sequenciados e utilizados em estudos de transcrição gênica (MEDEIROS *et al.*, 2008) e as técnicas de avaliação de atividade enzimática por estresse oxidativo também são bastante conhecidas (SOUZA, *et al.*, 2011; REGOLI *et al.*, 2002; ZANETTE *et al.*, 2008).

Contudo, o presente estudo propõe o uso da técnica de depuração, dando ênfase aos aspectos moleculares e bioquímicos do organismo em questão, *C. gigas*, buscando respostas que permitam atingir um maior grau de conhecimento dos mecanismos de ação antioxidante e da

expressão de genes perante desinfecção da água por radiação UV e recirculação.

Para a análise molecular, foi utilizada a técnica de RT-PCR quantitativo, verificando a expressão dos genes *FABP*, *CYP_{356A1}* e *GSTO* na brânquia e glândula digestiva de *C. gigas* em T₀ e T₂₄ com e sem exposição à radiação ultravioleta e recirculação de água.

Também foi utilizada a técnica de *Dot blotting* para a quantificação da expressão da proteína *CYP_{356A1}* através de anticorpo policlonal anti-*CYP_{356A1}* no tecido branquial e glândula digestiva. A atividade das enzimas CAT, GST, G6PDH, GPx, GR e SOD também foram analisadas.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Desenho experimental e coleta dos animais

Os exemplares de ostra *Crassostrea gigas* (peso de carne 18g ± 3,12), com tamanho comercial, foram coletados de dois locais, Ribeirão da Ilha e Foz do Rio Bucheler (local poluído por esgoto doméstico) (Figura 5).

O local 1, Ribeirão da Ilha, está situado, no sul da Ilha de Santa Catarina, na Fazenda Marinha Atlântico Sul Ltda (local de produção de ostras e mariscos). Este local foi considerado adequado para ser utilizado no presente estudo visto que os resultados de análises realizadas em trabalhos anteriores, tanto na água onde os moluscos são cultivados, quanto nas amostras de tecidos dos animais, mostraram que estão de acordo com os níveis permitidos pela legislação brasileira.

O local 2, está localizado na foz do Rio Bucheler, região da Grande Florianópolis. Este Rio drena uma pequena bacia hidrográfica altamente urbanizada, percorrendo cerca de 1800 metros até a foz, possuindo uma largura aproximada de 5 metros. Com uma concentração predominante de residências, condomínios e comércio no local, possui um reduzido volume de água, é constantemente assoreado e poluído, e descarga suas águas na Baía Norte justamente na divisa entre os municípios de São José e Florianópolis. Este efluente contém resíduos líquidos e sólidos e possui alto índice de contaminação (NUNES, 2008).

Para as análises designadas ao estudo em questão, os animais foram acondicionados em mini- balsas que continham gaiolas flutuantes, onde os animais permaneceram submersos por 14 dias a 10 cm da superfície. As ostras foram colocadas no mês de setembro de 2010 no local 1 e em

novembro de 2010, no local 2. Após o tempo de exposição, os exemplares foram retirados e rapidamente transportados ao LABCAI.



Figura 5. Mapa de localização dos pontos de exposição das ostras *C. gigas*. 1-Localização da Fazenda Marinha Atlântico Sul, Ribeirão da Ilha, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 2-Localização da Foz do Rio Bucheler, Grande Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Fonte: Modificado de Souza et.al (2011).

Para compor as amostras de tempo zero (T_0), os animais recém-chegados ao laboratório ($n=10$) foram dissecados. O restante dos animais foi acondicionado em dois tanques; um deles com sistema de depuração contendo radiação ultravioleta e recirculação de água ($n=10$) e outro sem sistema ultravioleta, somente com recirculação de água ($n=10$). A radiação UV utilizada foi de baixa pressão, marca Atman II, monocromática, comprimento de onda de 254nm, 36W, com dose mínima de $43.85\text{mJ}/\text{cm}^2$ em cada passagem de água pelo aparato de radiação UV. Os tanques depuradores comportaram 300L de água do mar proveniente do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) –

UFSC, com recirculação de 1800L/h (Figura 6). A temperatura da água variou de 21-22°C. Os animais não foram alimentados durante o período do experimento.

As brânquias e glândula digestiva das ostras foram coletadas em T_0 e T_{24} para análise da transcrição dos genes. Para a quantificação da proteína CYP_{356A1} e análise da atividade enzimática, brânquia (BR) e glândula digestiva (GD) foram retiradas em T_0 e T_7 dias (Tabela 2).

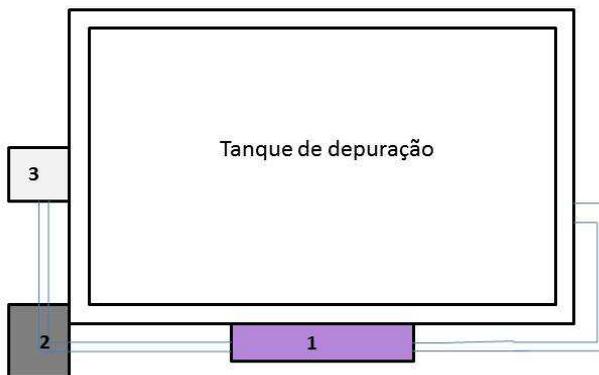


Figura 6. Esquema de recirculação de água no tanque de depuração. 1- lâmpada UV 36W; 2- Bomba de recirculação 1800L/h; 3- Entrada de água.

As amostras teciduais foram retiradas das ostras em ambos os tratamentos de depuração e somente T_0 não passou por estes tratamentos, servindo como tempo controle. Os tecidos designados à análise da transcrição de genes foram conservados em RNA Later e os demais, em nitrogênio líquido. Após, foram estocados em freezer -80°C até serem processados. Os procedimentos foram realizados da mesma maneira em ambas as exposições.

Transcrição de genes	Expressão da Proteína CYP_{356A1}	Atividade enzimática
<ul style="list-style-type: none"> • Coleta de BR e GL <ul style="list-style-type: none"> • T_0 ; n=10 • T_{24} sem UV; n=10 • T_{24} com UV; n=10 	<ul style="list-style-type: none"> • Coleta de BR e GL <ul style="list-style-type: none"> • T_0 ; n=10 • T_7 sem UV; n=10 • T_7 com UV; n=10 	<ul style="list-style-type: none"> • Coleta de BR e GL <ul style="list-style-type: none"> • T_0 ; n=10 • T_7 sem UV; n=10 • T_7 com UV; n=10

Tabela 2. Esquema do delineamento experimental utilizado para a coleta dos tecidos de *C. gigas* para as devidas análises subsequentes.

3.3.2 Preparação e padronização das amostras para análise molecular

As amostras de brânquia e glândula digestiva foram preparadas para extração do RNA total conforme protocolo para o reagente Trizol (Invitrogen). A extração do RNA total foi realizada nas amostras de T₀, T₂₄ sem UV e T₂₄ com UV (n= 5, pools de 2 animais).

A transcrição reversa para síntese de cDNA a partir de 2µg de RNA total, foi realizada utilizando o sistema Quantitec Reverse Transcription (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante.

Uma curva contendo 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300ng e 400ng de cDNA por reação de RT-PCR quantitativo foi realizada para calcular a eficiência da reação, onde uma curva padrão ótima apresenta valor de eficiência de 100% (duplica a quantidade de cDNA a cada ciclo). O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o ciclo limiar (Ct) foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R²) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

O Kit utilizado para verificar a repressão ou indução dos genes *GSTO*, *CYP_{356A1}* e *FABP* foi QuantiFast (Qiagen) e para a quantificação relativa da expressão de cada gene foi utilizado o método de comparação de Ct ou Delta Delta Ct ($\Delta\Delta$ CT). O Ct (cycle threshold - ciclo limiar) é definido como o número de ciclos requerido para a fluorescência da reação atingir níveis superiores aos da fluorescência basal da reação (background) e apresentar uma amplificação exponencial. Para utilizar este método, os valores de expressão para cada gene de interesse são normalizados pela transcrição de um gene normalizador e após esse processo é feita a relativização dos grupos expostos aos tratamentos, T₂₄ sem e T₂₄ com UV em relação ao grupo controle (T₀). Os genes normalizadores testados foram GAPDH, ACT e 28-S.

A concentração e a pureza do RNA total foram checadas em espectrofotômetro Nanodrop e através do perfil eletroforético das amostras extraídas, que foram separadas em gel de agarose 2%, confirmou-se a amplificação de um único produto de interesse, como mostra a figura 7.

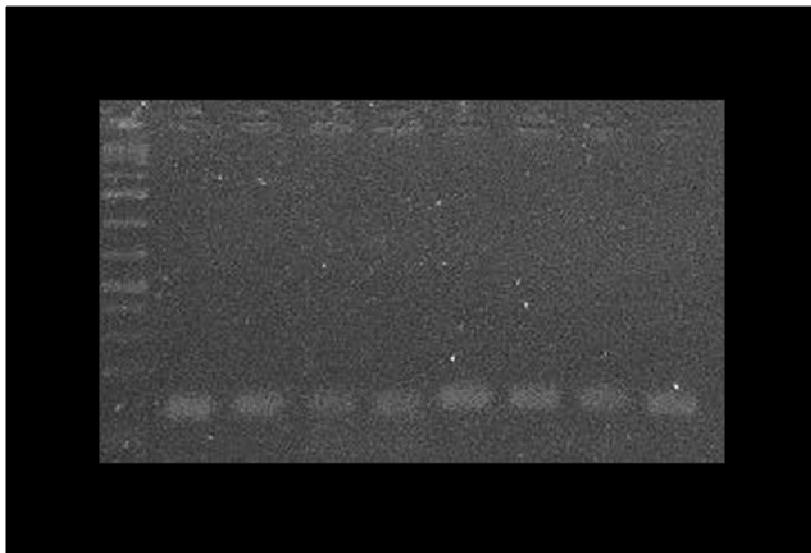


Figura 7. Amplificação dos genes glutationa S-Transferase ômega (*GSTO*), proteína ligante a ácidos graxos (*FABP*), citocromo P450 356A1 (*CYP_{356A1}*) e gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (*GAPDH*) em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: marcador de peso molecular (1kbp). 2: gene *GSTO*. 3: gene *FABP*. 4: gene *CYP_{356A1}*. 5: gene normalizador *GAPDH*. Todos os genes apresentaram apenas uma banda na faixa de 100-200 pares de base, confirmando a existência de apenas um produto na reação de RT-PCR.

Os iniciadores desenhados com base nas sequências de genes depositados no GenBank (GenBank EU073062 - *GSTO*, GenBank EU073425 - *FABP*, GenBank EF645271- *CYP_{356A1}* e GenBank CAD67717 - *GAPDH*), foram utilizados para análise da expressão gênica e desenhados de forma a produzirem amplicons menores que 200 pb, pois acima deste tamanho a eficiência da reação de qPCR é prejudicada (TOLEDO E SILVA, 2009; COSSEAU et al., 2009). (Anexo 1). Estes genes foram identificados em estudos anteriores em ostras *C. gigas* expostas ao esgoto doméstico (MEDEIROS et al., 2008). Os níveis de expressão gênica foram analisados por RT-PCR, Rotor Gene 6000, Qiagen.

3.3.3 Preparação e padronização das amostras para análise da proteína CYP_{356A1} através de anticorpos policlonais

As amostras de brânquia e glândula digestiva foram homogeneizadas com *Tissue tearor*, em tampão de homogeneização (Tris-HCl 20mM pH 7,6, EDTA 1mM, sacarose 0,5M, KCl 0,15M, DTT 1mM, PMSF 0,1mM), na proporção de 1g de tecido para 4mL de tampão. A fração homogeneizada foi centrifugada a 750 g por 10 minutos e a 12.000 g por mais 10 minutos. O sobrenadante foi colocado em tubos de ultracentrífuga e centrifugado por 70 minutos a 105.000 g. O sedimento (porção microssomal) formado foi ressuspenso com tampão de microssoma (0,1M TrisHCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1M KCl, 20% glicerol) e utilizado para as análises de expressão da proteína CYP_{356A1}. A determinação da concentração de proteína da fração microssomal foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

Para análise das amostras de BR e GD foi utilizada a técnica de *Dot blotting* onde 20µg de amostra foram pipetadas em membrana de nitrocelulose anteriormente hidratadas em água MiliQ por 10 minutos e em tampão CAPS 1X por mais 10 minutos. As amostras foram bloqueadas por 1 hora com agitação branda em solução de leite desnatado (0,01M de Tris, 0,1M de NaCl, pH7,5 (TBS), 0,1% vol/vol de Tween, 5% peso/vol de leite em pó desnatado). O bloqueio foi realizado para evitar possíveis sítios de interação inespecíficos entre a membrana e o anticorpo primário.

O anticorpo policlonal (primário) foi obtido através da imunização de camundongos com a proteína CgCYP_{356A1} recombinante purificada, em estudo anterior realizado no LABCAI/UFSC por Silva, 2010.

Após o bloqueio, a membrana passou por um processo de lavagem com tampão TBS 1X (5 lavagens de 5 min cada). Em seguida o anticorpo primário policlonal anti-CYP_{356A1} foi diluído em tampão de bloqueio e adicionado à membrana, que foi mantida a temperatura ambiente por 1h sob agitação constante. Três lavagens foram realizadas antes da incubação com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, diluído em tampão de bloqueio. Novamente a membrana foi mantida a temperatura ambiente por mais 1h de agitação branda e constante. Após a incubação, mais cinco lavagens foram realizadas com tampão TBS 1X.

Ensaio de *Western blotting* foram realizados para comprovar a expressão de uma única banda específica para CYP_{356A1}. As amostras microssomais dos tecidos em estudo foram analisadas por

imunodeteção onde a fração microsomal (20 µg) foi separada por eletroforese em gel de acrilamida/bisacrilamida 30% e após, a mesma metodologia de aplicação para *Dot Blotting* foi utilizada. Assim, a determinação da diluição adequada dos anticorpos primário e secundário foram testadas e definidas em 1:8000 para o anticorpo primário e 1:3000 para o anticorpo secundário, a qual foi utilizada em todos os ensaios.

Para análise dos resultados do *Dot blotting*, as bandas ou “dots” foram detectadas por ensaios de quimioluminescência.

3.3.4 Preparação e padronização das amostras para análise da atividade enzimática

As amostras de brânquia e glândula digestiva foram homogeneizadas com *Tissue tearor*, em tampão de homogeneização (Tris-HCl 20mM pH 7,6, EDTA 1mM, sacarose 0,5M, KCl 0,15M, DTT 1mM, PMSF 0,1mM), na proporção de 1g de tecido para 4mL de tampão (1:4). A fração homogeneizada foi centrifugada a 750 g por 10 minutos e a 12.000 g por mais 10 minutos. O sobrenadante foi colocado em tubos de ultracentrifuga e centrifugado por 70 minutos a 105.000 g. O sobrenadante novamente formado (porção citosólica) foi utilizado para as análises bioquímicas de atividade enzimática e quantificação de proteínas totais.

A atividade enzimática foi analisada conforme protocolo específico para cada enzima.

A CAT foi quantificada conforme Aebi (1984), em espectrofotômetro Ultrospec 3000, verificando a velocidade de decomposição do H₂O₂ através do decréscimo de absorbância a 240nm a 30°C. Para análise da atividade da GST foi utilizado o protocolo de Keen *et al.* (1976), verificando a formação de um conjugado CDNB-GSH que é quantificado a 340nm. A atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada através do aumento da absorbância provocado pela redução do NADP⁺ a NADPH a 340nm (GLOCK & McLEAN, 1953). A glutatona redutase (GR) utiliza os elétrons do NADPH para reduzir o substrato glutatona oxidada (GSSG) e o decréscimo da absorbância pode ser lida a 340nm (CARLBERG & MANNERVICK 1985). A enzima glutatona peroxidase (GPx) utiliza a glutatona reduzida (GSH) para reduzir um peróxido orgânico, como o peróxido de cumeno (Cu-OOH), originando glutatona dissulfídica (GSSG) no final da reação. A GSSG é reduzida pela enzima glutatona redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH. A taxa de

oxidação de NADPH foi acompanhada espectrofotometricamente a 340nm (WENDEL, 1981). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo a metodologia descrita por Mccord; Fridovich (1969), que se baseia na inibição da redução do citocromo c pelo O₂⁻. Esta inibição é medida através do aumento de absorbância em 550nm, a 25°C. A determinação da quantidade total de proteínas foi realizada de acordo com protocolo Bradford (1976) e serve como base de cálculo das enzimas citadas acima. Todas os ensaios enzimáticos, exceto CAT foram realizados em espectrofotômetro/fluorímetro SpectraMax M5.

3.3.5 Análise Estatística

Para a análise estatística da expressão de genes foi aplicado *Kruskal-Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison test*, pois as amostras não apresentaram normalidade. Para as análises de atividade enzimática, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e *post-test "Tukey's Multiple Comparison Test"*. Para análise dos dados de *Dot blotting*, foi realizada a quantificação densitométrica com a utilização do programa Scion Image. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e *post-test "Tukey's Multiple Comparison Test"* e adotado um nível de significância de 5%. Todos os dados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Transcrição de genes

Após o período de 24h de depuração das ostras com radiação UV, foi observado um padrão de diminuição da taxa de transcrição dos genes, *FABP*, *GSTO* e *CYP_{356A1}* na brânquia destes organismos em relação aos animais do T₀. A transcrição da *GSTO* apresentou uma redução significativa em sua transcrição em ambos os tratamentos de depuração nos animais oriundos do local 1, quando comparado ao T₀ (Figura 8). As ostras oriundas do local 2 apresentaram diferença significativa na transcrição da *FABP* e *GSTO* em ambos os tratamentos de depuração quando comparados ao T₀ (Figura 9). No entanto este resultado deve ser analisado com cautela, uma vez que foi observada uma tendência não significativa de maior expressão dos níveis de

transcrição do gene constitutivo *GAPDH* dos animais que vieram do local 2 e foram submetidos a depuração.

O normalizador utilizado para BR foi *GAPDH*, já para GD, todos os normalizadores testados apresentaram alteração pelo tratamento e, portanto não foi possível sua utilização. Assim, os resultados de transcrição gênica para glândula digestiva não estão sendo apresentados.

3.4.2 Expressão da proteína *CYP_{356A1}*

Após 7 dias de depuração em tanques com e sem radiação UV nenhuma alteração na expressão da proteína *CYP_{356A1}* no tecido branquial das ostras foi observado, quando comparados ao grupo controle (T_0) dos animais oriundos de ambos locais, respectivamente. Somente foi observada uma diferença estatística significativa quando os tratamentos de depuração com e sem UV foram comparados entre si, nos animais do local 1 (Figura 10).

3.4.3 Atividade enzimática

3.4.3.1 Catalase (CAT)

Após o período de depuração de 7 dias a atividade da CAT nas brânquias das ostras coletadas no local 1, Ribeirão, não apresentou diferença significativa em relação ao tempo zero, porém, na glândula digestiva houve aumento significativo em ambos os sistemas de depuração (Figura 11).

As ostras oriundas do local 2, Bucheler, que foram submetidos aos dois tratamentos de depuração por 7 dias apresentaram uma maior atividade da CAT em ambos tecidos em relação aos animais mortos no tempo zero (Figura 12).

Figura 8. Transcrição dos genes proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), citocromo P450 (*CYP_{356A1}*) e glutationa S-transferase classe ômega (*GSTO*) por RT-PCR em brânquia de ostras coletadas do local 1, Ribeirão da Ilha em T₀ e submetidas aos tratamentos de depuração sem e com radiação UV e recirculação de água por 24 horas. Os valores estão como média \pm desvio padrão. O gene da *GAPDH* foi utilizado como normalizador. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos foram identificadas por letras minúsculas.

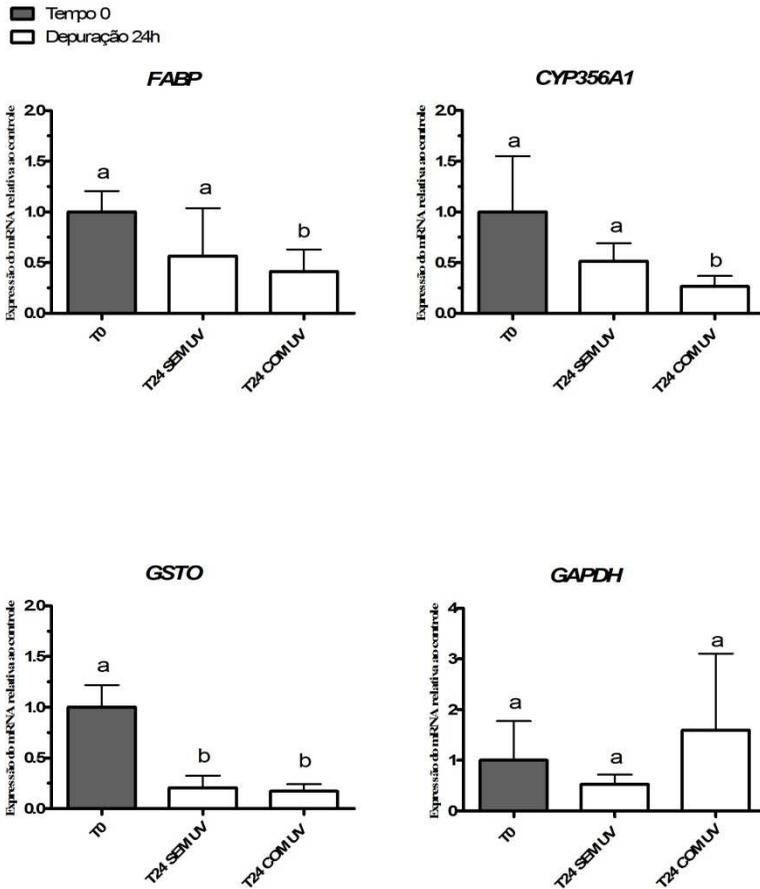


Figura 9. Transcrição dos genes da proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), citocromo P450 (*CYP_{356A1}*) e glutathione S-transferase classe ômega (*GSTO*) por RT-PCR em brânquia de ostras coletadas do local 2, Rio Bucheler em T₀ e submetidas aos tratamentos de depuração sem e com radiação UV e recirculação de água por 24 horas. Os valores estão como média ± desvio padrão. O gene da *GAPDH* foi utilizado como normalizador. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos foram identificadas por letras minúsculas.

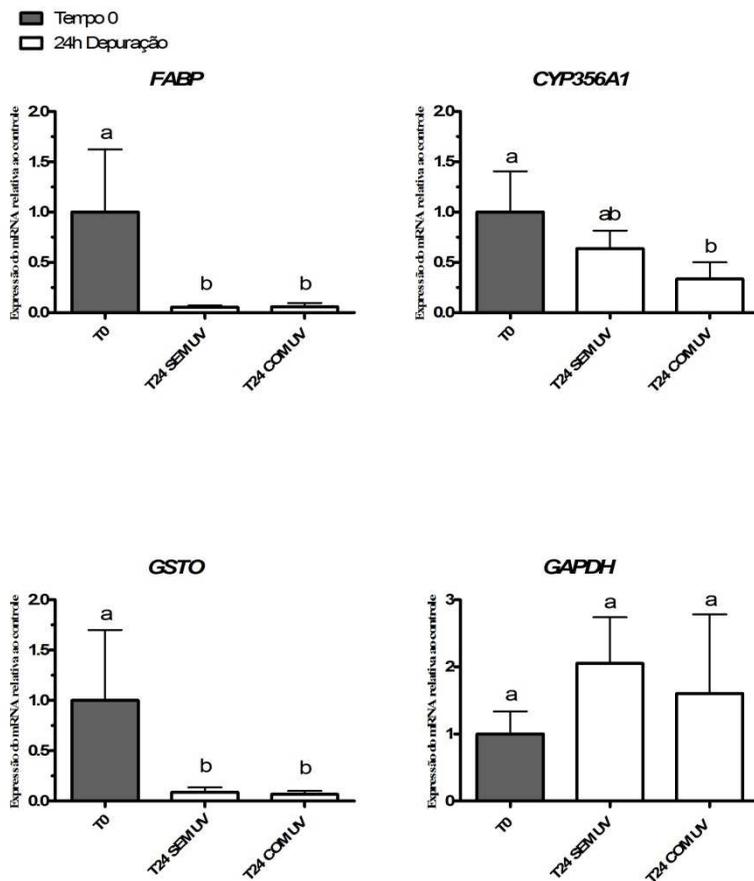
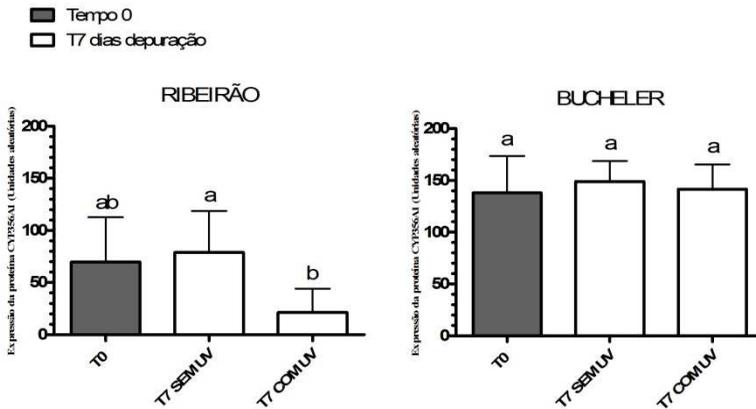


Figura 10. Análise densitométrica para avaliação da expressão da proteína CYP_{356A1} no tecido branquial de ostras provenientes do local 1 (Ribeirão da Ilha) e local 2 (Rio Bucheler) em T₀ e submetidas ao sistema de depuração sem e com radiação UV durante um período de 7 dias. Os resultados estão como densidade média. Os valores utilizados estão como média ± desvio padrão. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos foram identificadas por letras minúsculas.



3.4.3.2 Glutathione S-Transferase (GST)

Foi observada uma menor atividade da GST nas brânquias das ostras oriundas do local 1 e depuradas por 7 dias em tanques com radiação UV. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nesta enzima nos animais que permaneceram no tanque de depuração sem radiação UV. Da mesma forma, nenhuma alteração na GST da GD dos animais que vieram do local 1 foi observada, após a depuração com e sem UV (Figura 11).

Interessantemente, as ostras que vieram do local 2 (contaminado) apresentaram uma maior atividade da GST tanto na brânquia como na GD após terem sido mantidas por 7 dias no tanque de depuração com radiação UV (Figura 12).

3.4.3.3 Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

As ostras do local 1 apresentaram uma maior atividade da G6PDH na GD após a depuração por 7 dias nos tanques com e sem UV. Já nas brânquias esta alteração não foi observada (Figura 11). Os animais que vieram do Rio Bucheler (local 2) apresentaram um padrão de resposta paradoxal na atividade da G6PDH comparando-se a brânquia e a GD. No primeiro a atividade da G6PDH foi maior e no segundo, menor nos animais submetidos ao tratamento de depuração com radiação UV (Figura 12).

3.4.3.4 Glutaciona Peroxidase (GPx)

As ostras que vieram do local 1 (zona de cultivo) não apresentaram nenhuma alteração na atividade da GPx antes e após o período de depuração em ambos tecidos, com e sem radiação UV no tratamento (Figura 11). Por outro lado, a atividade da GPx na GD dos animais oriundos do local 2 foi significativamente maior tanto nos animais depurados por 7 dias em tanques com e sem UV. Um discreto aumento na GPx também foi observado na brânquia dos animais depurados com radiação UV (Figura 12).

3.4.3.5 Glutaciona Redutase (GR)

Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da GR tanto na brânquia, como na GD dos animais oriundos do local 1 e 2, antes e após a depuração com e sem radiação UV (Figuras 11 e 12).

3.4.3.6 Superóxido Dismutase (SOD)

Os animais do local 1 depurados em tanques com e sem radiação UV não apresentaram alteração na atividade da SOD em ambos tecidos analisados (Figura 11). Já os animais do local 2 depurados com e sem UV apresentaram uma atividade menor da SOD nas brânquias (Figura 12).

Figura 11. Atividade enzimática em brânquia e glândula digestiva de ostras *C. gigas* coletadas no local 1, Ribeirão da Ilha em T0 e expostas aos tratamentos de depuração sem e com radiação UV e recirculação de água por 7 dias. Os valores estão como média \pm desvio padrão para as enzimas catalase (CAT), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos foram identificadas por letras minúsculas no tecido branquial e por letras maiúsculas na glândula digestiva.

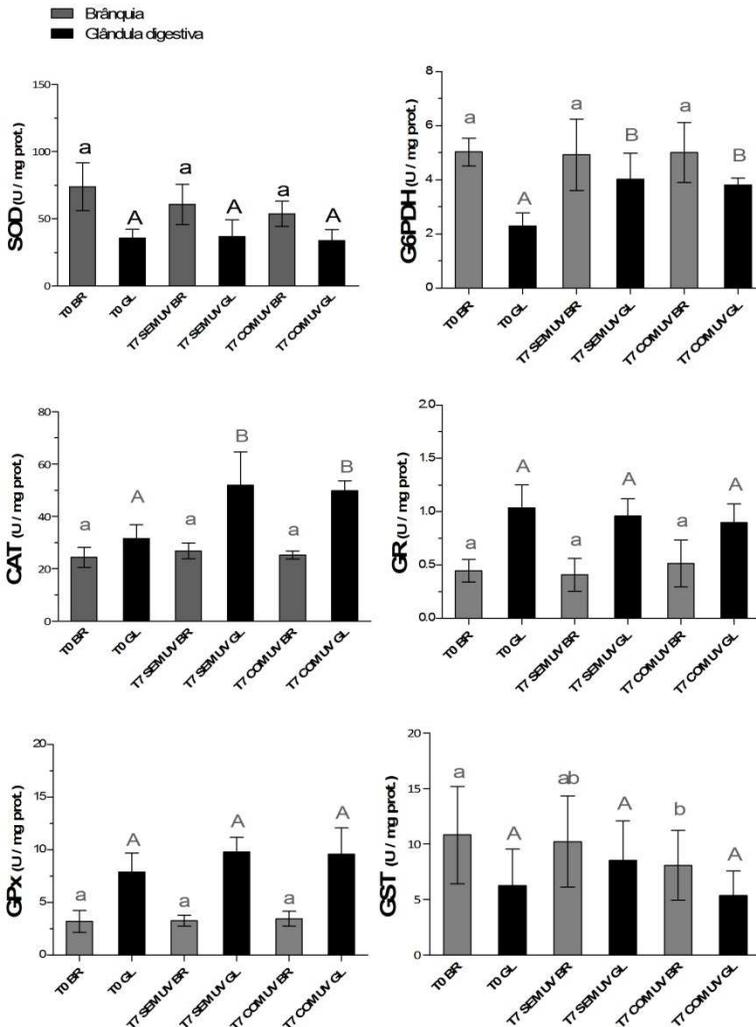
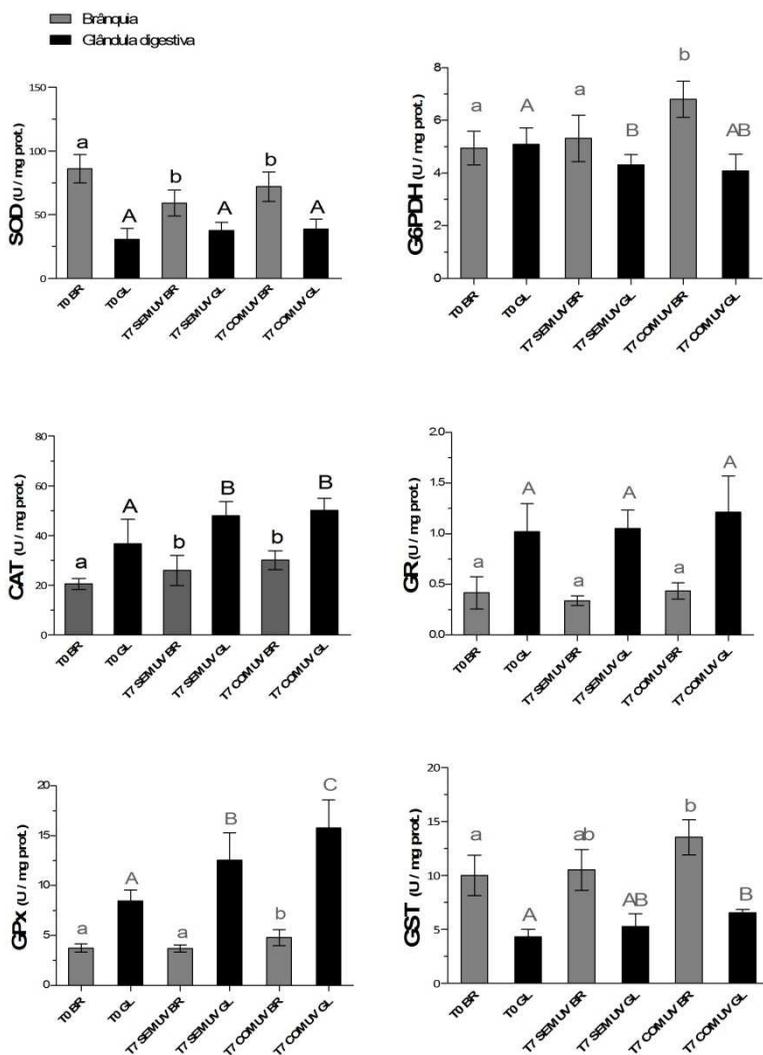


Figura 12. Atividade enzimática em brânquia e glândula digestiva de ostras *C. gigas* coletadas no local 2, Rio Bucheler em T0 e expostas aos tratamentos de depuração sem e com radiação UV e recirculação de água por 7 dias. Os valores estão como média \pm desvio padrão para as enzimas catalase (CAT), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glutationa S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos foram identificadas por letras minúsculas no tecido branquial e por letras maiúsculas na glândula digestiva.



TECIDO	TRAT.	ENZIMAS					
		SOD	CAT	GPx	GR	G6PDH	GST
BR	S/UV	x	x	x	x	x	x
	C/UV	x	x	x	x	x	↓
GD	S/UV	x	↑	x	x	↑	x
	C/UV	x	↑	x	x	↑	x

Tabela 3. Tabela demonstrativa da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutathione S-transferase (GST), nos tecidos de brânquia e glândula digestiva de ostras oriundas do local 1 (Ribeirão da Ilha), expostos a dois tratamentos (TRAT.), sem e com a utilização de radiação ultra-violeta. Legenda: seta indicando para cima: aumento da atividade enzimática. Setas indicando para baixo: redução da atividade enzimática. x: não houve alteração na atividade enzimática. Todas as indicações se referem à comparações feitas entre os tratamentos de depuração e o tratamento controle (T_0).

TECIDO	TRAT.	ENZIMAS					
		SOD	CAT	GPx	GR	G6PDH	GST
BR	S/UV	↓	↑	x	x	x	x
	C/UV	↓	↑	↑	x	↑	↑
GD	S/UV	x	↑	↑	x	↓	x
	C/UV	x	↑	↑	x	x	↑

Tabela 4 . Tabela demonstrativa da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx), Glutaciona Redutase (GR), Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutaciona S-transferase (GST), nos tecidos de brânquia e glândula digestiva de ostras oriundas do local 2 (Rio Bucheler), expostas a dois tratamentos (TRAT.), sem e com a utilização de radiação ultra-violeta. Legenda: seta indicando para cima: aumento da atividade enzimática. Seta indicando para baixo: redução da atividade enzimática. x: não houve alteração na atividade enzimática. Todas as indicações se referem à comparações feitas entre os tratamentos de depuração e o tratamento controle (T_0).

3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou um conjunto de parâmetros bioquímicos e moleculares em ostras mantidas por 14 dias em dois ambientes com graus de contaminação ambiental distintos (referência - apto para o cultivo; e exposto - contaminado) e posteriormente depuradas em sistema de recirculação de água com e sem radiação UV por 24h e 7 dias. Após o período de 24h de depuração, a transcrição dos genes *FABP*, *CYP356A1* e *GSTO* foi analisada por RT-PCR quantitativo na brânquia das ostras. Após o período de 7 dias de depuração foram analisados parâmetros bioquímicos. Entre os parâmetros analisados

estão a atividade das enzimas que atuam direta ou indiretamente nas defesas antioxidantes SOD, GPx, CAT, GR, G6PDH e GST, assim como, a expressão da proteína CYP_{356A_1} utilizando-se anticorpos policlonais.

3.5.1 Transcrição de genes CYP_{356A_1} , $FABP$ e $GSTO$

Em termos gerais foi observada uma diminuição da transcrição de todos os genes analisados no tecido branquial das ostras após o período de 24h de depuração, fato este que pode ter sido ocasionado pela circulação de água mais limpa no organismo, diminuindo a concentração de xenobióticos e microrganismos e aumentando a biotransformação e a excreção dos poluentes dos tecidos animais.

Os genes CYP_{356A_1} e $FABP$ no tecido branquial das ostras provenientes do Ribeirão da Ilha apresentaram diferença significativa quando o tratamento sem UV foi comparado com o tratamento UV, sugerindo que a presença de microrganismos e outros contaminantes podem afetar de alguma maneira, a expressão destes genes. No entanto, este resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que os níveis de transcrição do gene constitutivo $GAPDH$ nos animais tratados com UV apresentaram uma maior variação, apesar de não ter sido estatisticamente diferente dos outros grupos. Os animais oriundos do local 2, Rio Bucheler, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos sem e com UV para os mesmos genes, sugerindo que possa ter ocorrido uma redução na transcrição dos genes quando o animal é exposto à altas cargas de poluição por esgoto doméstico e posteriormente transportado para um habitat mais limpo, independente do tratamento de depuração utilizado.

Da mesma forma nenhuma diferença na transcrição do gene $GSTO$ dos animais oriundos de ambos os locais foi observada após terem sido submetidos aos dois tratamentos de depuração, com e sem radiação UV, o que sugere que a modulação do gene $GSTO$ não é influenciada pela presença de microrganismos.

Considerando-se, por um lado, que os genes $FABP$, $GSTO$ e CYP_{356A_1} estão envolvidos na biotransformação e detoxificação de xenobióticos, e por outro, que são induzidos na presença de esgoto doméstico (MEDEIROS *et. al.*, 2008), a diminuição da transcrição destes genes após o período de 24h de depuração sugere que este tratamento foi eficiente como meio complementar de detoxificação de microrganismos e contaminantes. No entanto, uma análise da transcrição destes genes após períodos de depuração mais prolongados,

concomitante com análises microbiológicas e químicas deveriam ser realizados a fim de comprovar esta hipótese.

3.5.2 Expressão da proteína *CYP_{356A1}*

Os resultados das análises da expressão da proteína *CYP_{356A1}* realizadas nas amostras de tecido branquial das ostras oriundas do local 2 (contaminado) demonstraram que não houve diferença em sua expressão, sugerindo que a presença de contaminantes e microrganismos não alteraram sua expressão, corroborando com os resultados de Silva (2010) que verificou um aumento na expressão da proteína *CYP_{356A1}* somente na glândula digestiva de *C. gigas* expostas ao esgoto doméstico por 14 dias; no tecido branquial não foram observadas diferenças significativas. No entanto, os animais do local 1 (cultivo) submetidos a depuração de 7 dias com radiação UV apresentaram valores de *CYP_{356A1}* menores nas brânquias quando comparados aos que ficaram sem radiação UV, o que sugere que quando os níveis de contaminantes são menores, a presença de microrganismos nos tecidos poderia estar afetando a expressão desta proteína.

Concordando com este resultado, conforme mencionado anteriormente, foi observada uma redução na transcrição do gene *CYP_{356A1}* quando os animais foram expostos à depuração com radiação UV por 24h. Este fato sugere que a transcrição dos genes poderia estar sendo alterada pela presença de microrganismos.

Como a expressão dos genes foi verificada em 24h e a expressão da proteína, em 7 dias, pode-se sugerir que o gene reduziu sua expressão e que a proteína possa ter sofrido variações durante o período de 7 dias, posteriormente atingindo o equilíbrio, voltando aos níveis basais, ou que viesse a sofrer redução caso o tempo de depuração fosse ainda maior.

Destacamos ainda a diferença de valores (unidades aleatórias) de densidade média da expressão da proteína *CYP_{356A1}* que nos animais do local 2 apresentaram aproximadamente o dobro da quantidade de proteínas dos animais do local 1.

As análises feitas na GD não puderam ser concluídas, pois as bandas ou “dots” das amostras em T_0 de ambos locais não foram detectadas; porém, as bandas em T_7 sem e com tratamento UV ficaram bastante nítidas. Como é conhecida a expressão desta proteína em locais contaminados por esgoto doméstico, as amostras de T_0 , ao menos no local 2, deveriam ser bastante expressas, com tendência à redução nos demais tratamentos. No entanto, algum fator desconhecido pode ter afetado a imunoreatividade dos anticorpos dos animais de T_0 .

As amostras de GD em T₀ apresentavam coloração escura, bem diferentes das amostras após 7 dias de depuração e das amostras de BR. Esta coloração é devida a alimentação, já que a glândula digestiva é responsável pela digestão dos alimentos, como algas, fito e zooplâncton, matéria orgânica, que possuem compostos pigmentados. Talvez esta coloração possa ter interferido nas análises de *Dot Blotting* por alguma razão ainda desconhecida, ou ainda, por algum outro fator não identificado.

3.5.3 Atividade enzimática

A BR das ostras coletadas no local 1, Ribeirão da Ilha, e submetidas a depuração por 7 dias não apresentaram alteração na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, sugerindo que tanto a dismutação dos radicais ânions superóxido, quanto a degradação dos peróxidos formados foram constantes, fato este que pode vir a ocorrer quando os animais estão presentes em um habitat onde os níveis de microrganismos e poluentes não são considerados altos, como é o caso do Ribeirão da Ilha, área de produção de moluscos bivalves. As enzimas auxiliares, G6PDH e GR também não apresentaram variações significativas, demonstrando haver um equilíbrio celular neste tecido dos organismos coletados neste local. A única variação significativa foi verificada na atividade da GST, que apresentou valores menores nos animais depurados com radiação UV, sugerindo que a atividade de conjugação de xenobióticos decaiu pelo fato de que os microrganismos (mesmo que em quantidades não tão expressivas neste local) presentes nos animais coletados no T₀ foram realmente reduzidos e assim, a enzima teve sua atividade diminuída. Freitas, R., et al., 2012, verificaram que as enzimas CAT, SOD e GST apresentaram uma diminuição de atividade após 7 dias de depuração com recirculação de água, nas espécies *Ruditapes philippinarum* e *Ruditapes decussatus* coletadas inicialmente de um estuário onde os níveis de contaminação eram baixos.

A GD das ostras oriundas do local 1 e submetidas a depuração com e sem radiação UV apresentou uma maior atividade das enzimas G6PDH e CAT do que os animais do T₀. Este aumento sugere uma maior necessidade de decomposição de peróxidos e produção de NADPH, evidenciando uma resposta protetora antioxidante da GD. Interessante notar que durante o período de depuração os animais não foram alimentados, o que poderia desencadear uma queda na atividade da G6PDH, mas paradoxalmente esta enzima estava maior, mesmo após

7 dias de depuração. Não está claro quais fatores foram os responsáveis por desencadear este aumento, uma vez que os animais eram oriundos de uma área menos impactada por contaminantes. Mesmo assim é possível que durante a biotransformação de pequenas quantidades de contaminantes possam ter causado um leve aumento na atividade destas enzimas. Por outro lado, foi observada uma menor atividade da G6PDH na GD dos animais do local 2, que foram depurados. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que os níveis pretéritos diferenciais de contaminantes em uma população de ostras poderiam afetar a capacidade de resposta enzimática dos organismos, corroborando com os resultados de El-Shenawy, 2004 que verificou uma eficiência na depuração (após 4 dias) de microrganismos, como bactérias e fagos, somente quando os animais foram coletados de locais onde os níveis de contaminação eram baixos.

Uma atividade significativamente maior das enzimas CAT, G6PDH, GST foi observada nas BR das ostras provenientes do local 2, Rio Bucheler, e depuradas por 7 dias, quando comparado aos animais do T₀. Interessante observar que a GPx, GST e G6PDH apresentaram valores maiores nos animais depurados em tanque tratado com radiação UV do que sem UV, o que indica que de alguma maneira a contaminação microbiológica pode afetar negativamente a atividade destas enzimas nas brânquias. Somente a GR não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Na GD das ostras do local 2 foi observada uma maior atividade da GST, GPx e CAT. Os resultados apresentados demonstram uma divergência de respostas visto que o esperado seria que a atividade das enzimas antioxidantes diminuísse em função da depuração dos animais. O alto grau de contaminação por esgoto doméstico observado no local 2 (dados não mostrados) pode ter ocasionado um desequilíbrio geral no metabolismo das ostras, gerando um aumento na produção de EROs. Isto pode sugerir que para as ostras oriundas do local 2, os tratamentos com depuração UV não foram eficientes da maneira que foram aplicados.

Considerando os fatores de resistência de alguns microrganismos à radiação UV, intensidade da radiação UV aplicada e altos níveis de xenobióticos nos tecidos dos animais, pode-se especular que os organismos provenientes do local 2 estivessem mais vulneráveis ao ataque de patógenos e efeitos decorrentes da biotransformação de compostos químicos, gerando um dano oxidativo celular, aumentando a produção de EROS o que desencadearia um aumento nas defesas antioxidantes. Outros fatores a serem considerados seriam o tempo dos tratamentos de depuração; turbidez da água, atenuando os efeitos

danosos da radiação UV; redução do metabolismo dos animais pelo fato de não receberem alimento durante o experimento; inibições enzimáticas relacionadas com a presença de inibidores em função de ambientes muito contaminados, onde a defesa enzimática entra em desequilíbrio, causando danos ao organismo (ALMEIDA, 2003).

3.6 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que os tratamentos de depuração com e sem radiação UV, respectivamente por 24h e 7 dias, causaram modificações nas respostas moleculares e bioquímicas das BR e GD das ostras previamente expostas a locais com diferentes graus de contaminação por esgoto doméstico.

Foi observada uma diminuição da transcrição de genes de biotransformação após o período de 24h de depuração sugerindo uma boa eficiência no sistema de depuração adotado. No entanto esta queda poderia ser atribuída ao jejum que os animais foram submetidos durante este período. Uma análise da transcrição destes genes após períodos de depuração mais prolongados, concomitante com análises microbiológicas e químicas deveriam ser realizados a fim de comprovar esta hipótese.

O tratamento com radiação UV no sistema de depuração dos animais oriundos da estação de cultivo parece ter causado uma diminuição da expressão de *CYP_{356A1}* na brânquia das ostras, o que sugere que quando os níveis de contaminantes são menores, a presença de microrganismos nos tecidos poderia estar afetando a expressão desta proteína.

Em termos gerais as ostras que vieram de um local mais contaminado por esgoto doméstico apresentaram um aumento nas respostas antioxidantes. Podemos concluir que o monitoramento dos parâmetros analisados dependem inicialmente da concentração de contaminantes do meio.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

AEBI, H. 1984. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis, 105, 121, 125, London Academic Press.

ALMEIDA, E. A., 2003. Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental. Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. Endereço eletrônico:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-06082008-150607/>. Acesso em 15/12/11.

AU, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin** 48, 817–834.

BARBIOR, B. M., 2004. NADPH oxidase: Rewiew. **Current Opinion in Immunology**, 16:42–47. DOI 10.1016/j.coi.2003.12.001

BICOUT, D. J.; FIELD, M. J.; GOUET, P. JOUVE, H. M., 1995. Simulations of electron transfer in the NADPH-bound catalase from *Proteus mirabilis* PR. **Biochimica et Biophysica Acta** 1252, 172-176

BRADFORD, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences**. 72:248-254.

BRAY, T.M.; LEVY, M.A., 2000. Assessment of oxidative stress: Concepts and approaches. In: BRAY, T.M.; SCHOENE, N.W. (Eds.). **Models and methods in cell signaling and gene expression: Applications to oxidative stress research**. London: OICA International, p 1-14.

BURGEOT, T. et al., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v 131, p 125-141. 1996.

CAJARAVILLE, M.P. *et al.*, 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B., 1985. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**. 113,484–490.

CHIRONNA, M. *et al.*, 2002. Detection of hepatitis A virus in mussel from different sources marketed in Puglia region (South Italy). **Internacional Journal of Food Microbiology**, v75, n 1-2, p 11-18.

CORRÊA, A. X. R.; TIEPO, E. N.; SOMENSI, C. A.; SPERB, R. M.; RADETSKI, C. M. 2010. Use of Ozone-Photocatalytic Oxidation, O₃/UV/TiO₂ and Biological Remediation for Treatment of Produced Water from Petroleum Refineries. **Journal of Environmental Engineering**. DOI: 10.1061/ASCEEE.1943-7870.0000111

EL-SHINAWY, N. S., 2004. Heavy-Metal and Microbial Depuration of the Clam *Ruditapes decussatus* and Its Effect on Bivalve Behavior and Physiology. Wiley Periodicals, Inc. DOI 10.1002/tox.20007, p 143-153.

EPA, 2006. United States Environmental Protection Agency. Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. **Office of Water** (4601) EPA 815-R-06-007.

Endereço eletrônico:

<http://www.epa.gov/safewater/disinfection/lt2/compliance.html>. Acesso em: 23/12/2011.

FAO, 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy. The State of Food Insecurity in the World – 2006. Eradicating world hunger – taking stock ten years after the World Food Summit. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0750e/a0750e00.pdf>

FONG, T.T.; LIPP, E.K., 2005. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 69, p 357-371.

FREITAS, R., et al., 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*, Estuarine, Coastal and Shelf Science, doi:10.1016/j.ecss.2012.01.011

GLOCK, G.E., MCLEAN, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6 phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal** 55, 400–408.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of Hazardous Materials** 166,1134–1140.

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

LEAL, D.A.G. *et al.*, 2011. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**, in press doi:10.1016/j.ocecoaman.2011.07.010

LEE, R.J., YOUNGER, A.D., 2002. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International Biodeterioration and Biodegradation** 50, p. 177 - 183.

LEES, D., 2000. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology** 59, 81–116.

MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**. 244, 6049–6055.

MEDEIROS, I.D., SIEBERT, M.N., TOLEDO-SILVA, G.; MORAES, M.O., MARQUES, M.R.F., BAINY, A.C.D., 2008. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research** 66, 156–157.

MEDEIROS, I.D., SIEBERT, M.N., TOLEDO-SILVA, G., RODRIGUES, T. B, MARQUES, M. R. F, BAINY, A. C. D., 2008. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 26: 362–365.

MUKIJA, M. I.; GIRONES, R.; QUESADA, G. T.; CALVO, M. LUCENA, F., 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal of Food Microbiology** 77, 125– 133.

NORDBERG, J; ARNER, ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p. 1287-1312.

NUNES, F.F. Avaliação in situ da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. 73 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aquicultura). Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2008.

RECOS, 2003. Manual de Procedimentos. Seção 3 – Biomarcadores. **Grupo de Qualidade Ambiental e Biodiversidade (QUIABO)** – Instituto do Milênio – MCT.

REGOLI, F., GORBI, S., FRENZILLI, G., NIGRO, M., CORSI, I., FOCARDI, S., WINSTON, W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**. 54, 419–423.

RHEE, J.S., LEE, Y.M., HWANG, D.S., LEE, K.W., KIM, I.C., SHIN, K.H., RAISUDDIN, S., LEE, J.S., 2007. Molecular cloning and characterization of omega class glutathione S-transferase (GST-O) from the polychaete *Neanthes succinea*: biochemical comparison with theta class glutathione S-transferase (GST-T). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology** 146, 471– 477.

RUPP, G. S., PARSON, G. J., 2004. Effects of salinity and temperature on the survival and byssal attachment of the lion’s paw scallop *Nodipecten nodosus* at its southern distribution limit. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 309, 173– 198.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E., 2006. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v 256, p 1-14. SHEEHAN, D.; POWER A., 1999. Effects of seasonality on xenobióticos and antioxidants defence mechanisms of bivalve mollusks. **Comparative biochemistry and physiology**, Part C, v 123, p 193-199.

SILVA, C. R. 2010. Expressão heteróloga de citocromo P450356A1 de *Crassostrea gigas* e utilização para Biomonitoramento ambiental. **Dissertação de mestrado** submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

SOUZA, D.S.M., *et al.*, 2011. Evaluation of tropical water sources and molluscs in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology Environmental Safety**. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.09.01

STORCH, J.; THUMSER, A.E., 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1486(1) p. 28-44.

SÜß, J.; VOLZA S.; OBSTA U.; SCHWARTZA T.; 2009. Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. **Water Research** 43, 3705-3716.

TOLEDO E SILVA, 2009. Análise da expressão gênica diferencial em ostras-do-pacífico *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico in situ. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M., 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189, 41-54.

WALKER, C.H., et al., 1996. Principles of Ecotoxicology. **Londres: Taylor & Francis**, 321p.

WENDEL, A., 1981. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. 77, 325–333.

ZANETTE J., NUNES, F. F., MEDEIROS I. D., SIEBERT, M. N., MATTOS, J. J., LÜCHMANN, K. H., MELO, C. M. R. BAINY, A. C. D., 2008. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, Volum 66, Issue 1, Pages 196-198.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ALMEIDA, E. A., 2003. Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental. Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. Endereço eletrônico: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-06082008-150607/>. Acesso em 15/12/11.
- AVERY, E. L.; DUNSTAN, R. H.; NELL, J. A., 1998. The use of lipid metabolic profiling to assess the biological impact of marine sewage pollution. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p.229-235.
- BABIOR, B. M. 2004. NADPH Oxidase. **Current Opinion in Immunology**, 16:42–47. DOI 10.1016/j.coi.2003.12.001
- BAREA, J.L.; PUEYO, C. 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research** 399, 3–15.
- BERKHOLZ, DS; FABER, HR; SAVVIDES, SN; KARPLUS, PA. 2008. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.382, p. 371-384, 2008.
- BETHIZY, J.D.; HAYES, J.R. 1994. Metabolism: a determinant of toxicology. **Principles and methods of toxicology**. A. W. Hayes. New York, Raven Press, Ltd.:59-100.
- BLANCHETTE, B; FENG, X; SINGH, BR. 2007. Marine Glutathione S-Transferases. **Marine Biotechnology**, v.9, p.513-542.
- BICOUT, D. J.; FIELD M. J.; GOUET, P.; JOUVE, H. M. 1995. Simulations of electron transfer in the NADPH-bound catalase from *Proteus mirabilis* PR. **Biochimica et Biophysica Acta** 1252:172-176.
- BOLONG, N.; ISMAIL, A.F.; SALIM, M.R.; MATSUURA, T.; 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229-246.
- BOUTET, I., TANGUY, A., MORAGA, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene** 329, 147–157.
- BRAGA, ELISABETE S.; BONETTI, CARLA V. D. H.; BURONE, LETICIA; BONETTI, JARBAS FILHO, 2000. Eutrophication and Bacterial Pollution

Caused by Industrial and Domestic Wastes at the Baixada Santista Estuarine System, Brazil. **Marine Pollution Bulletin** Vol. 40, No. 2, pp. 165-173.

BRASIL, 2010. **Meio Ambiente. Recursos Hídricos**. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.brasil.gov.br/sobre/meio-ambiente/recursos-hidricos>. Acesso em 07/12/11.

BURGEOT, T. et al., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v 131, p 125-141. 1996.

BUTT, A.A., ALDRIDGE, K.E., SANDERS, C.V., 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. **The Lancet Infectious Diseases**. 4, 294 e 300.

CAJARAVILLE, M.P. *et al.*, 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311.

CASTELLVÍ-PIULACHS, J. 1972. Depuración de moluscos: su fisiología. **Instituto de Investigaciones Pesqueras**. 36 (2) págs 311-326.

DEPLEDGE, M. H., 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Leonzuo, M. C. F. C. ed. **Nondestructive Biomarkers in Vertebrates**. Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers. P. 1993.

EDWARDS, R. J.; ADAMS, D. A.; WATTS, PATRICIA S.; DAVIES, D. S.; BOOBIS, A. R. 1998. Development of a Comprehensive Panel of Antibodies against the Major Xenobiotic Metabolising Forms of Cytochrome P450 in Humans. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 377-387.

EPAGRI, 2010. **Síntese Informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no Estado de Santa Catarina em 2010**. Disponível no endereço: http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=140&Itemid=173. Acesso em: 07/12/2011.

ESTEVES, A.; EHRLICH, R., 2006. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142(3-4), p. 262-74.

FRIDOVICH, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.64, p. 97-112.

GADAGBUI, B., JAMES, M., 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. **Aquatic Toxicology**, 49, 27–37.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. 2007. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press.,704p.

HASEMANN, C. A.; KURUMBAIL, R. G.; BODDUPALLI, S. S.; PETERSON, J. A.; DEISENHOFER, J., 1995. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. **Current Biology** Ltd ISSN 0969-2126 41, Vol 3, 41-62.

HIJNEN, W.A.M., BEERENDONK, E.F., MEDEMA, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. **Water Research**, 40, 3 e 22.

IBGE, 2008. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico** e Coordenação de Trabalho e Rendimento, **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. Disponível no endereço eletrônico:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf. Acesso em 07/12/11.

IBGE, 2011. **Censo 2010: população do Brasil é de 190.732.694 pessoas**.

Disponível no endereço eletrônico:

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1766. Acesso em 02/11/11.

ICES, 2004. Report of the ICES Advisory Committee on Fishery Management and Advisory Committee on Ecosystems. **ICES Advice**, 1. 1544 pp.

JACOBI, P., 2011. **A água na terra está se esgotando? É verdade que no futuro próximo teremos uma guerra pela água?** Disponível no endereço eletrônico: <http://www.geologo.com.br/aguahisteria.asp>. Acesso em 02/11/11.

LEAL, D.A.G. *et al.*, 2011. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**, in press doi:10.1016/j.ocecoaman.2011.07.010

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

LUEDEKING, A.; KOEHLER, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology** 69:1–10

MPA – MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – DIDAQ - Programa Nacional de Controle Higiénico-Sanitário de Moluscos Bivalves, 2011. Disponível no endereço eletrônico: [http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico\(MoluscosBivalves\).html](http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico(MoluscosBivalves).html). Acesso em: 12/12/11.

MUNIAIN-MUJIKA, I.; R. GIRONES; G. TOFINO-QUESADA; M. CALVO; F. LUCENA. 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal Food Microbiology**, v.77, n.1-2, Aug 25, p.125-33.

MUNRO, 2007. Review Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. Andrew W. Munro, Hazel M. Girvan, Kirsty J. McLean. **Biochimica et Biophysica Acta** 1770, 345–359.

NORDBERG, J; ARNER, ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p. 1287-1312,

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research** 567, 109–149.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2005. **Projeto do Milênio**. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.pnud.org.br/milenio/ft10.php>. Acesso em 06/11/2011.

PEREIRA, R. S., 2004. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH-UFROS. V.1, n.1, p.20-36. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.abrh.org.br/informacoes/rerh.pdf>. Acesso em 06/11/11.

PETUSHOK, N.; GABRYELAK, T.; PAŁECZ, D.; ZAVODNIK, L.; SZOLLOSI, I. V.; DEÉR, K. A., 2002. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. **Aquatic Toxicology** 61, 65–72.

PHILLIPS, D. J. H.; RAINBOW, P. S., 1993. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. ed. London. Elsevier Applied Science. p. 371.

PMF, 2008. Termo de referência. Anexo I. Concorrência n.º 666/sadm/dlcc/2008. **Elaboração do plano municipal integrado de saneamento básico do município de Florianópolis. Estado de Santa**

Catarina. Prefeitura Municipal de Florianópolis, Diretoria Central de Licitações, Contratos e Convênios. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/uploads/governo.pdf>. Acesso em 07/12/11.

POLI, C.R., 2004. Cultivo de Ostras do Pacífico (*Crassostreas gigas* 1852). In: In: Poli, C.R, Poli A. T. B.; Andreatta, E.; Beltrame, E. (orgs). **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Multifatorial editora. Florianópolis, p.251-266.

RAND, G.M., 1995. Effects, environmental fate, and risk assessment. **Washington: Taylor & Francis**, 1125p.

RECOs, 2003. Manual de Procedimentos. Seção 3 – Biomarcadores. **Grupo de Qualidade Ambiental e Biodiversidade (QUIABO)** – Instituto do Milênio – MCT.

REGOLI, F., GORBI, S., FRENZILLI, G., NIGRO, M., CORSI, I., FOCARDI, S., WINSTON, W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**. 54, 419–423.

REWITZ, K. F.; STYRISHAVE B.; A. LØBNER-OLESEN, O. ANDERSEN, 2006. Review: Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 143, 363–381.

SAMPAYO-REYES; ZAKHARYAN., 2006. Inhibition of human glutathione S-transferase omega by tocopherol succinate. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60(5), p. 238- 44.

RIGOTTO, C; SINCERO, T.C.M.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M., 2005. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, v.39, p 297-304.

ROWE, L. A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P., 2008. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology & Medicine** 45, 1167–1177.

RUPP, G.S., DE BEM, M.M., 2004. Cultivo de Vieiras. In: Poli, C.R, Poli A. T. B.; Andreatta, E.; Beltrame, E. (orgs). **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Multifatorial editora. Florianópolis, p.289-308.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v 256, p 1-14. 2006.

SALÁNKI, J.; FARKAS, A.; KAMARDINA, T., RÓZSA, K. S. 2003. Molluscs in biological monitoring of water quality. **Toxicology Letters** 140-141, 403-410.

SERAFIM, C.F.S., HAZIN, F. **O ecossistema costeiro**. In: CHAVES, P.T. (Org.) Geografia: o mar no espaço geográfico. Brasília: Ministério da Educação. Secretaria da Educação Básica, 2006, pag. 103.

SILVA, C. R. 2010. Expressão heteróloga de citocromo P450356A1 de *Crassostrea gigas* e utilização para Biomonitoramento ambiental. **Dissertação de mestrado** submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

SIMON-GIAVAROTTI, K.A., 2001. Estudo do estresse oxidativo hepático induzido por lindano em um modelo de hipertireoidismo experimental. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, Instituto de Química. <http://pandora.cisc.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-25092006144806/publico/KASGiavarotti.pdf> acesso em 29/11/2011.

SLEKAR, KH; KOSMAN, DJ; CULOTTA, VC. 1996. The yeast copper zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p. 28831-28836.

SNYDER, M., 1998. Cytochrome P450 enzymes belonging to the CYP4 family from marine invertebrates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249(1), p. 187-190.

SQUELLA, F. J. L. Taxas fisiológicas alimentares e potencial de crescimento da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758) cultivada em ambiente com alta concentração de seston. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, UFSC.

SUB, J.; VOLZA B. S.; OBST, U.; SCHWARTZ, T. Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. 2009. **Water research** 43: 3705-3716.

STEGEMAN, J.J., HAHN, M.E., 1994. Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. **Lewis Publishers**. CRC Press, Boca Raton. pp. 87-206.

TIMBRELL, J. A., 1991. **Principles of biochemical toxicology**. Ed. J.A. Timbrell, ed. Taylor & Francis, Londres.

TOLEDO E SILVA, G.; SIEBERT M. N.; MEDEIROS I. D.; SINCERO, T. C. M.; MORAES, M. O.; GOLDSTONE, J. V.; BAINY, A. C. D., 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (*CYP356A1*) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research** 66, 15–18.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189:41- 54.

WALKER, C.H., et al., 1996. Principles of Ecotoxicology. **Londres: Taylor & Francis**, 321p.

WILDISH, D.; KRISTMANSON, D.1997. Benthic suspension feeders and flow. **Cambridge Univ, Press**, Cambridge. pp 128-169.

WOLFE, R.L., 1990. Ultraviolet disinfection of potable water. **Environmental Science & Technology** 24 (6), 768–773.

ZANETTE, J. 2003. Influência da salinidade sobre biomarcadores de contaminação aquática em ostras do mangue (*Crassostrea rhizophorae* – Guilging 1828) expostas a diferentes concentrações de óleo diesel. Trabalho apresentado ao Curso de Ciências Biológicas –UFSC, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E., 1999. Biomarkers of free radical damage Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 26, Nos. 1/2, pp. 202–226.

ANEXOS

Anexo 1. Sequência dos pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes alvos e tamanho dos amplicons, nas brânquias de *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico não tratado. Fonte: TOLEDO E SILVA, 2009).

Gene	Acesso GeneBank	Sequência dos iniciadores		Amplicons
		Forward	Reverse	
ACT	AB071191	ATGTCCCCAGGTATTGCTGACCGT	TCCACATCTGTTGGAAGGTGGACA	157
GAPDH	CAD67717	AAGCAACAAGGATTGGCGTGGT	AACTGGTACGCGGAAAGCCATT	182
28S	AF137051	TGTGCGCAAGTCATTGGGTGTT	ACCATCTTTCGGGTACCAACGTGT	103
FABP	EU069496	TCCGACGGAAAGATGACGCTTT	ACGCCATTGCATGTTGCTGT	116
GSTO	AJ557141	TGATGAGTTCACCACCGCAA	TTCAAACCATGGCCACAGCA	155
CYP356A1	EF645271	ATGAAACCCGCGAAACCA GA	TAAATTCGGCTTCACGCCCT	156