



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica  
Laboratório de Defesas Celulares

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO SELÊNIO E AO  
COBRE SOBRE AS DEFESAS ANTIOXIDANTES DE MEXILHÕES  
MARINHOS *Perna perna***

**MARCELA ULIANO DA SILVA**

FLORIANÓPOLIS, NOVEMBRO DE 2010.



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica  
Laboratório de Defesas Celulares

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO SELÊNIO E AO  
COBRE SOBRE AS DEFESAS ANTIOXIDANTES DE MEXILHÕES  
MARINHOS *Perna perna***

**MARCELA ULIANO DA SILVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como um dos pré-requisitos para a obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Alcir Luiz Dafré

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC.

FLORIANÓPOLIS, NOVEMBRO DE 2010.

“A Terra não pertence ao homem; o Homem pertence à Terra. Todas as coisas estão conectadas como o sangue que nos une a todos. O Homem não teceu a teia da vida, ele é meramente um de seus fios. O que quer que seja que ele faça à teia, ele estará fazendo a si mesmo.”

(Cacique Seattle)

“O todo é muito mais do que a soma de suas partes.”

(Aristóteles)

Dedico este trabalho ao meu melhor  
amigo; meu pai Rogério Pereira da Silva.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de iniciar demonstrando o quando considero essa sessão de agradecimentos especial. É um dos poucos momentos na vida em que podemos expressar em palavras a gratidão que sentimos pelas pessoas que nos são tão caras. É quase impossível definir quais são as pessoas mais importantes que devem ser citadas aqui, uma vez que certamente todas as pessoas que fizeram parte da minha vida, mesmo antes do período da realização desse estudo, deixaram uma marca e contribuíram para que este trabalho final terminasse como está. Mas em especial, não poderia deixar de agradecer a;

Minha família, minha mãe Zulma, meu pai Rogério, meu irmão Felipe e minha cunhada Júlia. Vocês são tudo para mim. Certamente a melhor família que Deus poderia ter me dado. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu orientador, Alcir Luiz Dafré. Com certeza absoluta, o melhor orientador que eu poderia ter. Gostaria que você soubesse que sou profundamente grata por toda a confiança e apoio a mim confiados durante esses anos de iniciação científica. Agradeço não só pela orientação constante e presente durante todos esses anos, mas também pela amizade.

Ao Jeferson Luis Franco, agradeço por toda a paciência e pela ajuda durante os primeiros anos de minha iniciação científica; com certeza, você tem papel fundamental na minha história acadêmica até aqui.

Aos colegas de laboratório, Rafael Trevisan, Samira, Luiz, Mariana, Danielle e Anderson. Agradeço a vocês imensamente por todo o apoio durante o período de experimentos, por terem suportado meu mau humor durante os períodos de pressão e trabalho intensos, e também pelos momentos especiais que passamos juntos fora do lab. Em especial, gostaria de agradecer ao Trevisan e à Dani, pela ajuda direta com os experimentos deste trabalho. À Samira, agradeço pela amizade forte construída nestes últimos anos.

Às minhas grandes amigas, Julia Back, Mel Simionato e Priscila Serafin. Vocês são minha segunda família, as irmãs que eu escolhi para a vida.

A todos os “meninos da engenharia”, amigos com quem passei a maior parte do meu tempo livre durante os anos de graduação. Em especial aos meus grandes amigos Mark, Mandu e Thiago Boff. Vou levar nossa amizade para a vida e vou sempre lembrar dos anos incríveis que passamos juntos durante este período de faculdade; com certeza, os melhores da minha vida até agora.

Aos amigos especiais da bio, Mari, Ju Gusmão, Ju Gaeta, Celo, Alê, Tiri, e tantos outros que estão guardados na minha lembrança. A vocês, o meu muito obrigada por terem compartilhado comigo esses anos tão incríveis.

Às meninas de Criciúma, Gabai, Gabit, Kell e Mi. Vocês estavam comigo no período mais crucial para a formação de minha personalidade; a adolescência. Com certeza, vocês têm muita influência na pessoa que sou hoje em dia. A vocês, meu muito obrigada.

A Thiago Augusto Pimenta Viana, pelo apoio, pelo carinho, pelos belos momentos que passamos juntos neste ano; muitos deles na frente da televisão junto com uma tigela de sorvete. A você, meu carinho inesgotável e meu muito obrigada. Sua existência com certeza deixa minha vida mais alegre.

A todos vocês que dividiram sorrisos, lágrimas e tantos momentos comigo, estando citados aqui nestes texto ou não, o meu muito obrigada. Este trabalho também é de vocês.

## RESUMO

Embora muitos metais, como o cobre, sejam essenciais para os organismos, o seu uso industrial e na agricultura tem levado a um aumento de sua concentração na natureza. Uma vez em altas concentrações, este metal pode tornar-se tóxico e ameaçar a saúde de organismos marinhos. Além disso, em corpos aquáticos, é freqüentemente relatada a presença de compostos protetores, como o selênio. Desta forma, este trabalho foi dividido em duas partes: na primeira, mexilhões *Perna perna* foram expostos a diversas concentrações de cobre por 96 horas, a fim de se ter uma estimativa da toxicidade deste metal. A concentração letal 50% em 96 horas foi de  $245 \mu\text{gl}^{-1}$  ( $\text{CL}_{50,96\text{h}}$ ) e a maior concentração sem efeito foi a de  $80 \mu\text{gl}^{-1}$  ( $\text{CL}_{0,96\text{h}}$ ). Após esta etapa, os animais foram expostos à 30, 60, 180 e  $540 \mu\text{gl}^{-1}$  de cobre, a fim de determinar danos oxidativos em brânquias. Houve um aumento nos níveis de glutathione total para todas as concentrações testadas, exceto para  $30 \mu\text{gl}^{-1}$ . A atividade da enzima glutathione redutase foi menor nos animais expostos a  $540 \mu\text{gl}^{-1}$ , e a atividade da tioredoxina redutase foi menor em todas as concentrações exceto na de  $60 \mu\text{gl}^{-1}$ . Não foi detectada nenhuma alteração significativa na atividade das enzimas catalase e glutathione S-transferase. Houve um aumento no índice de dano no DNA de hemócitos de animais expostos a 180 e  $540 \mu\text{gl}^{-1}$ . Na segunda parte deste trabalho, mexilhões *Perna perna* foram expostos a  $8 \mu\text{gl}^{-1}$  de selênio por 72 horas e mantidos por mais 72 horas, quando as análises bioquímicas foram realizadas. Após este período, enzimas antioxidantes e o estado tiólico foram mensurados nas brânquias destes animais. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade das enzimas glutathione redutase, tioredoxina redutase, glutathione peroxidase dependente de selênio e glutathione S-transferase. Os níveis de glutathione e tióis protéicos também não foram alterados pelo tratamento com selênio. Estes resultados demonstram que o cobre tem ação pró-oxidante em brânquias de mexilhões *Perna perna*, uma vez que causa dano ao DNA e diminui a atividade das enzimas glutathione redutase e tioredoxina redutase. Por outro lado, os níveis aumentados de glutathione parecem ser uma resposta de proteção contra os efeitos deletérios gerados pela exposição ao cobre. Além disso, este estudo demonstrou que exposição ao selênio não causa alteração em várias defesas antioxidantes na brânquia do mexilhão *Perna perna*. Estes dados diferem daqueles encontrados por outros autores que estudaram exposição ao selênio no mexilhão *Mytilus edulis*. Desta forma, pode-se concluir que a exposição ao selênio leva a respostas antioxidantes diferentes entre espécies que habitam clima temperado e subtropical.

**Palavras-chave:** *Perna perna*, sistema antioxidante, estresse oxidativo, cobre, selênio, glutathiona, exposição aguda.

## **ABSTRACT**

Although some heavy metals as copper have real importance for organisms, the industrial and agricultural use has increased its release in the environment. Once in excess this metal can turn to be toxic and hazard the marine organisms. Besides that, the presence of protective compounds such as selenium in the aquatic environment has been reported. In this way, this work was divided in two parts. At the first one, *Perna perna* mussels were expose to several concentrations of copper during 96 hours to estimate the toxicity of this metal. The 50% lethal concentration found for 96 hours exposure was  $245\mu\text{gl}^{-1}$  ( $\text{CL}_{50,96\text{h}}$ ) and the highest concentration without effect was  $60\mu\text{gl}^{-1}$  ( $\text{CL}_{0,96\text{h}}$ ). Afterwards the mussels were exposed to 30, 60, 180 and  $540\mu\text{gl}^{-1}$  of copper to determine the oxidative damage caused on gills. There was an increase in glutathione levels for all the concentrations tested except for  $30\mu\text{gl}^{-1}$ . The glutathione reductase activity was lower in animals exposed to  $540\mu\text{l}^{-1}$  and the thioredoxin reductase activity was lower for all concentrations tested except for  $60\mu\text{gl}^{-1}$ . No changes were found in catalase and glutathione S-transferase enzyme activities. There was an increase in DNA damage index in haemocytes of animals exposed to 180 and  $540\mu\text{gl}^{-1}$ . At the second part of this study, *Perna perna* were exposed to  $8\mu\text{gl}^{-1}$  of selenium for 72 hours and left for more 72 hours in clean sea water when the biochemical analyses were carried out. After this period, antioxidant enzymes and the thiolic status were measured on gills. No significant differences were found in the activity of glutathione reductase, thioredoxin reductase, selenium dependent glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. An addition, the glutathione and protein thiol levels did not change with selenium treatment. These results demonstrated that copper has a pro-oxidant action on the *Perna perna* gills as it caused DNA damage and decreased the glutathione reductase and thioredoxin reductase enzymes activities. On the other hand, the increased levels of glutathione seem to be a protective response against the deleterious effects generated by copper exposure. Besides that, this work has shown that exposition to selenium did not cause any changes in a diverse of antioxidant enzymes measured in the mussel *Perna perna*. This data is in opposition to some results found for other authors that have studied selenium exposure in the

mussel *Mytilus edulis*. In this way we can conclude that an exposition to selenium leads to different antioxidant responses between species that inhabits temperate and subtropical climate.

**Keywords:** *Perna perna*, antioxidant system, oxidative stress, copper, selenium, glutathione, acute exposure

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO .....	1
1.1 – Contaminação das águas .....	1
1.2 - Ecotoxicologia e biomarcadores.....	2
1.3 - O uso de bivalves no monitoramento ambiental.....	2
1.4 – Estresse oxidativo e Espécies Reativas do Oxigênio .....	3
1.5 – Defesas antioxidantes.....	5
1.6- Defesas antioxidantes e o papel do Selênio.....	6
1.7 – Danos oxidativos causados pelo Cobre.....	7
2 - JUSTIFICATIVA.....	8
3 - OBJETIVOS.....	9
3.1- Objetivos gerais .....	9
3.2- Objetivos específicos.....	9
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 – Animais e sua manutenção.....	10
4.2- Determinação dos efeitos da exposição ao cobre .....	10
4.3- Estudo 1: Exposições ao cobre .....	11
4.4 – Estudo 2: Exposição ao selênio.....	11
4.5 – Preparação das amostras .....	11
4.6 - Danos ao DNA pelo teste do cometa.....	12
4.7 – Parâmetros Bioquímicos .....	13
4.7.1 - Níveis totais de glutathiona (GSH-t) .....	13
4.7.2 - Tióis não protéicos (NPSH) e protéicos (PSH) .....	13
4.7.3 - Glutathiona redutase (GR) .....	14
4.7.4 - Glutathiona peroxidase (GPx).....	14
4.7.5 - Glutathiona S-transferase (GST).....	15
4.7.6 - Catalase (CAT).....	15
4.7.7 - Tioredoxina Redutase (TrxR) .....	15
4.7.8 - Dosagem de proteína.....	16

4.7.9 - <i>Análise estatística</i> .....	16
5 - RESULTADOS .....	17
5.1 – Estudo 1: Mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao cobre .....	17
5.1.1 - <i>Determinação da toxicidade aguda do cobre</i> .....	17
5.1.2 - <i>Concentrações efetivas de cobre</i> .....	18
5.1.3 – <i>Glutathiona total (GSH-t) e tióis não protéicos em brânquias</i> .....	18
5.1.4 – <i>Atividade de enzimas antioxidantes</i> .....	19
5.1.5- <i>Dano ao DNA estimado pelo teste do cometa</i> .....	20
5.2 - Estudo 2: Exposição ao selênio .....	21
5.2.1- <i>Glutathiona total (GSH-t) e tióis não protéicos em brânquias do mexilhão Perna perna</i> .....	21
5.2.2- <i>Atividade de enzimas antioxidantes</i> .....	22
6 – DISCUSSÃO .....	23
6.1 – Estudo 1: Mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao cobre .....	23
6.1.1- <i>Toxicidade aguda do cobre em mexilhões Perna perna</i> .....	23
6.1.2 - <i>Insulto oxidativo causado por cobre em animais expostos à diferentes concentrações deste metal</i> .....	23
6.1.3 – <i>Atividade das enzimas antioxidantes</i> .....	25
6.1.4- <i>Danos no DNA</i> .....	26
6.2 - Estudo 2: Efeito do selênio sobre as defesas antioxidantes do mexilhão <i>Perna perna</i> .....	26
7 - CONCLUSÕES .....	28
7.1- Estudo 1: Mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao cobre .....	28
7.2 - Estudo 2: Mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao selênio .....	28
8 - PERSPECTIVAS .....	29
9 – REFERÊNCIAS .....	30

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio.....	4
Figura 2: Análise da toxicidade aguda do cobre em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a várias concentrações de cobre por 96 horas.....	17
Figura 3: Níveis tiólicos em brânquias de mexilhão <i>Perna perna</i> após 72 horas de exposição ao cobre.....	19
Figura 4: Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de mexilhões <i>Perna perna</i> após 72 horas de exposição à cobre.....	20
Figura 5: Danos ao DNA mensurados pelo teste do cometa em hemócitos de mexilhão <i>Perna perna</i> após 72 horas de exposição ao cobre.....	21
Tabela 1: Níveis tiólicos em brânquias de mexilhão <i>Perna perna</i> expostos ao selênio.....	22
Tabela 2: Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias e plasma de hemolinfa de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao selênio.....	22

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Contaminação das águas

A maior parte da diversidade de organismos vivos da Terra está localizada em regiões geográficas específicas do globo como as áreas costeiras e as bacias hidrográficas (Moore *et al.*, 2004a). Uma vez que o ambiente aquático possui uma complexa rede de relações e interações entre animais, plantas e microorganismos, ele detêm um papel fundamental na manutenção de vários ecossistemas (Trevisan 2008). Além disso, há ainda a grande importância para o homem, uma vez que estas áreas disponibilizam muitos recursos considerados bases da alimentação de muitas populações humanas. Desta forma, a preservação de tais ambientes é muito importante.

Alguns autores têm reconhecido o paradoxo entre o papel da água como um recurso vital, mas também como um veículo para a eliminação de poluentes (Schnurstein & Braunbeck 2001). Apesar da importância desses corpos d'água, sua integridade vem sendo seriamente ameaçada no decorrer das últimas décadas. A quantidade de poluentes encontrados em corpos d'água vem aumentando substancialmente em todo o mundo, concomitantemente ao nível de modernização das grandes cidades (Cajaraville *et al.*, 2000; Kehrig *et al.*, 2002). A biota marinha costeira vem sofrendo duramente com o crescente aporte de poluentes químicos oriundos principalmente de corpos dulciaquícolas continentais (Viana 2005). Estes rios recebem doses diárias de dejetos de origem antropogênica, onde o receptor final destes compostos químicos tóxicos é o ambiente marinho (Edwards *et al.*, 2001; Hseu 2004).

A poluição das águas por metais aparece como questão relevante e se torna alvo de grande atenção (Regoli & Principato 1995). Embora muitos metais, como o cobre sejam essenciais para os organismos vivos, o seu uso industrial e na agricultura tem levado a um aumento de sua concentração na natureza (Geret *et al.*, 2002). Uma vez em altas concentrações, este metal pode tornar-se tóxico e ameaçar a saúde dos organismos marinhos.

## 1.2 - Ecotoxicologia e biomarcadores

Tendo em vista que as atividades antrópicas causam impactos cada vez mais severos no ambiente aquático, uma crescente preocupação com a qualidade da água vem entrando em pauta nas últimas décadas. Estudos macroecológicos a fim de prever os danos causados por esta pressão são, em geral, demasiadamente complexos, uma vez que os efeitos observáveis sobre a biota local tendem a levar um longo período de tempo para se manifestar. Desta forma, os resultados observáveis a partir desses estudos ecológicos são, via de regra, situações irreversíveis, tais como: perda de biodiversidade, destruição de habitat e declínio populacional (Levinton 1995; Moore *et al.*, 2004a). A detecção mais precoce (a níveis moleculares e/ou celulares) dos efeitos causados por xenobiontes lançados nos corpos d'água é uma alternativa que permite a detecção de alterações na biota antes destes contaminantes atingirem níveis de contaminação que produzam danos irreversíveis. Este cenário impulsionou o desenvolvimento de um ramo da ciência conhecido como *Ecotoxicologia*. Este termo foi sugerido pela primeira vez pelo toxicologista René Truhaut, em 1969. O objetivo da *Ecotoxicologia* é entender e prever efeitos de xenobiontes em comunidades naturais sobre pressão antrópica (Chapman 2002).

A *Ecotoxicologia*, entre outros, utiliza como ferramenta o uso de biomarcadores (Moore *et al.*, 2004b). Em ecotoxicologia, biomarcadores são alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais que podem ser correlacionadas com indicadores ambientais (Monserrat *et al.*, 2007). De um modo geral, qualquer substância, ou seu derivado, estrutura ou processo que possa ser detectado em um organismo e que possa prever ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença chama-se biomarcador (WHO 2001).

## 1.3 - O uso de bivalves no monitoramento ambiental

O uso de moluscos bivalves, em particular mexilhões, como sentinelas para o monitoramento de contaminação por xenobiontes - e neste caso, em especial, por metais - em ambientes costeiros tem sido estabelecido por vários estudos laboratoriais e de campo (Nicholson 2001; Regoli & Orlando 1994; Regoli & Principato 1995). Estes animais têm uma série de características que os tornam qualificados para tal, como por exemplo, seu hábito de vida sésil e

filtrador que os deixa sujeitos a exposição a diferentes tipos de xenobiontes e outros estresses em um ambiente determinado. Além disso, esses bivalves possuem outras características que os tornam bons indicadores de contaminação ambiental, tais como: ampla distribuição geográfica, tolerância a alterações ambientais e a vários tipos de contaminantes, tolerância suficiente para sobreviver em laboratório e gaiolas em estudos de campo, além da capacidade de bioacumulação de poluentes (Mello 2009; Zhou *et al.*, 2008).

#### 1.4 – Estresse oxidativo e Espécies Reativas do Oxigênio

Danos oxidativos podem ser causados por espécies reativas de oxigênio (ERO), atacando a estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. O estresse oxidativo se dá a partir de um desbalanço entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes dos organismos, em favor do primeiro (Sies 1997).

As ERO são consideradas o lado negro do chamado “paradoxo do oxigênio” (Monserrat *et al.*, 2007). Isto é dito por que o oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbicos. Ele participa da produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos (e também na membrana celular de bactérias), além de fazer parte de inúmeras vias metabólicas fundamentais. No entanto, durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, o oxigênio pode gerar ERO, que podem ser tóxicas a nível intracelular e extracelular. As ERO mais conhecidas são o oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) (Halliwell & Gutteridge 2007).

As ERO são moléculas instáveis e de reatividade relativamente rápida. Por exemplo, o radical hidroxila, pode reagir rapidamente com inúmeras moléculas com reatividade da ordem de  $k = >10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Halliwell & Gutteridge 2007). Já o peróxido de hidrogênio, reage apenas com algumas substâncias com uma taxa de reação de  $k = 2.26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Carballal *et al.*, 2003). Desta forma, os efeitos biológicos causados pelas ERO dependem da sua taxa e local de formação, ambiente, compartilhamento celular e etc.

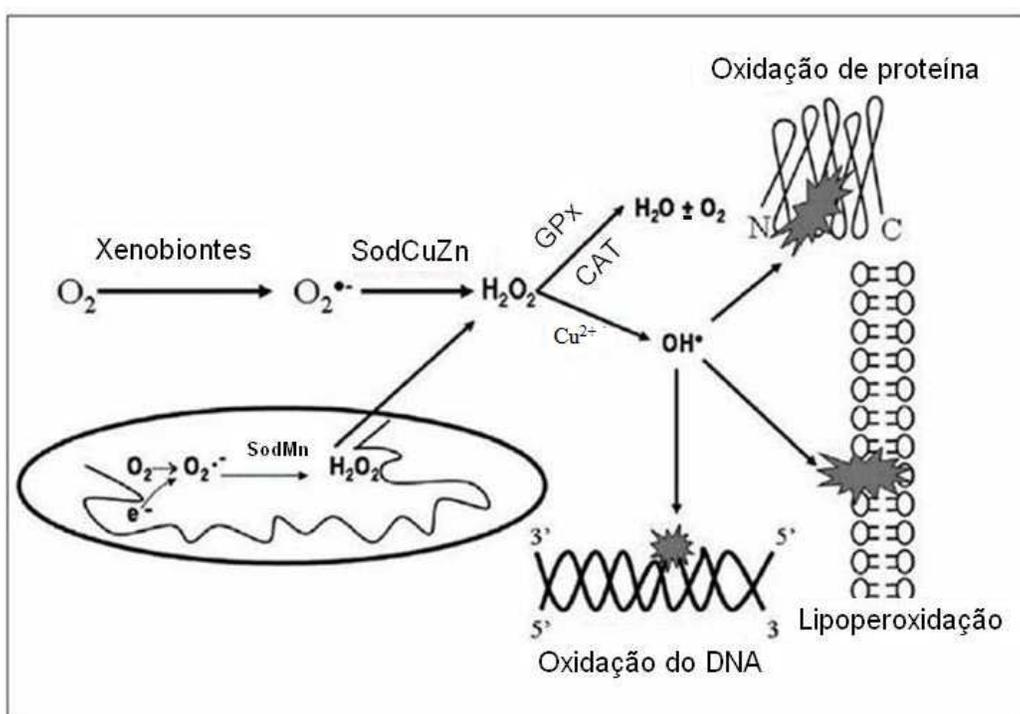
Trabalhos mais atuais estão elucidando que a formação das ERO nos sistemas biológicos não é inteiramente uma consequência deletéria (Droge 2002). Essas moléculas possuem

importantes funções celulares, como, por exemplo, participando da sinalização celular. No entanto, o ataque das ERO às biomoléculas pode causar disfunções celulares importantes (Giarratano *et al.*, 2010). Os danos oxidativos causados pelas ERO podem ocorrer, entre outros, através da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de danos oxidativos causados a moléculas de DNA.

Altas concentrações de cobre podem causar distúrbios celulares, especialmente devido à toxicidade gerada pelas ERO. O cobre atua de modo similar ao ferro, como um catalisador na decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como mostrado a seguir a partir de reação de Fenton:



Metais de transição reagem com  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando complexos intermediários, que em seguida se decompõem formando o radical  $\cdot\text{OH}$ , altamente reativo (Figura 1).



**Figura 1: Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio.** O cobre pode catalisar a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando o radical  $\cdot\text{OH}$  que é altamente reativo e pode levar à oxidação do DNA, lipoperoxidação e oxidação de proteínas. (Adaptado de Ramakrishnan *et al.*, 2007)

## 1.5 – Defesas antioxidantes

Todos os possíveis efeitos adversos das ERO se dão a partir de uma situação de desequilíbrio encontrada entre a formação de ERO e a quantidade e bom funcionamento das defesas antioxidantes dos organismos. Ou seja, os organismos vivos possuem defesas antioxidantes capazes de evitar o efeito deletério destas ERO, geradas pelo metabolismo aeróbio, as quais estão organizadas em diferentes níveis.

As defesas antioxidantes podem agir de forma a evitar a produção de ERO, neutralizando os efeitos nocivos destas, ou ainda reparando os danos ocasionados por elas. Assim, pode-se definir defesas antioxidantes como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (Halliwell & Gutteridge 2007). As defesas antioxidantes podem, ainda, ser divididas entre não enzimáticas (glutationa (GSH) e as vitaminas E, A e C) e enzimáticas (superóxido dismutase (SOD), catalase, e as peroxidases) (Bodnar 2009).

O tripeptídeo GSH é a defesa antioxidante não enzimática mais abundante e bem conhecida. Ela é composta por  $\gamma$ -glutamil-cisteínil-glicina e atua contra a formação de ERO, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos (Halliwell & Gutteridge 2007). A capacidade antioxidante da GSH está no grupamento reativo de sua cisteína, o grupamento tiol (SH), o qual também é encontrado em algumas proteínas (PSH) e em tióis de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína (Reischl *et al.*, 2007).

A GSH pode reagir com várias ERO, como o radical hidroxila, peróxinitrito e peróxidos orgânicos. Este tiol também participa do sistema antioxidante agindo como co-fator de diversas enzimas e processos metabólicos, como o sistema da glutaciona peroxidase (GPx), protege tióis protéicos contra oxidação e atua como principal tampão redox celular (Halliwell & Gutteridge 2007).

As enzimas catalase (CAT) e GPx participam principalmente da detoxificação de peróxidos. A CAT dismuta diretamente o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e está localizada em maior abundância nos peroxissomos (Reid *et al.*, 1981). A GPx está relacionada com a função antioxidante da GSH tendo atividade peroxidásica contra o  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos. São conhecidas pelo menos 4 isoformas de GPx; todas contendo selênio. O selênio está presente na

forma de selenocisteína, uma cisteína com um selênio no lugar do átomo de enxofre, o qual é facilmente ionizável em pH fisiológico (Halliwell & Gutteridge 2007).

Além da atividade da GPx, outros processos oxidativos celulares levam à formação da forma dissulfeto da glutathiona (GSSG). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathiona redutase (GR) reduz a GSSG às custas de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular (Halliwell & Gutteridge 2007).

Outra enzima que está relacionada à GSH é a glutathiona S-transferase (GST). Esta enzima é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos à GSH, reduzindo seus efeitos tóxicos e permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular. São conhecidas diversas isoformas da GST, mas estas possuem um número variado de funções como o transporte intracelular de proteínas e atividade glutathiona peroxidásica. Esta última ocorre porque a GST tem a capacidade de utilizar os elétrons da GSH na metabolização de peróxidos orgânicos, gerando GSSG e o respectivo álcool (Halliwell & Gutteridge 2007).

A tioredoxina redutase (TrxR) é responsável pela ciclagem da tioredoxina, uma proteína doadora de elétrons envolvida no ciclo catalítico da peroxiredoxina (Prx). Assim como a GR, a TrxR está indiretamente envolvida com processos de defesas antioxidantes celulares, por permitir a ciclagem da Prx (Chen *et al.*, 2006). Um das funções da família das Prx é a degradação de diferentes tipos de peróxidos, desde peróxidos pequenos como o  $H_2O_2$  até peróxidos mais longos e hidrofóbicos como o peróxido de cumeno, atuando através de seus resíduos de cisteína. As Prxs possuem 2 cisteínas em sua estrutura: a cisteína peroxidásica (ou catalítica), e a cisteína de resolução (ou auxiliar). A cisteína peroxidásica é responsável pela redução do peróxido, tornando-se ácido sulfênico. Essa cisteína peroxidásica oxidada irá reagir com a cisteína de resolução de outra subunidade do dímero Prx, gerando uma ponte dissulfeto. Essas pontes dissulfeto serão reduzidas pela Trx, a qual ficará oxidada na forma de pontes disulfeto (Andoh *et al.*, 2002).

## **1.6- Defesas antioxidantes e o papel do Selênio**

O selênio (Se) é um elemento encontrado naturalmente na natureza. Embora seja tóxico quando em altas concentrações (Hamilton 2004), quantidades traço desse elemento têm papel

crucial dando forma ao centro ativo de enzimas antioxidantes como a glutathiona-peroxidase (GPx), e a tioredoxina redutase (TrxR) (Arner & Holmgren 2000b; Flohe *et al.*, 1973).

A deficiência de Se não é tão documentada quanto sua toxicidade, mas, é igualmente significativa. Ficou provado que sua deficiência causa retardamento do crescimento e morte em salmões (Watanabe *et al.*, 1997). Além disso, Hardy e colaboradores (2010) mostraram que a suplementação crônica com Se reduz a mortalidade de peixes durante a reprodução.

Estudos têm mostrado que o selênio pode exercer função protetora contra a ação tóxica de metais pesados como o mercúrio e cádmio (Burger *et al.*, 2001; Cuvin & Furness 1998; Tran *et al.*, 2007). Estes trabalhos mostram que após o tratamento com mercúrio, o Se foi capaz de aumentar a atividade da enzima GPx no plasma do mexilhão *M. edulis* reduzindo/impedindo dano ao DNA. Uma pré-exposição ao Se, seguido de exposição ao cobre pode diminuir a bioacumulação deste metal em bivalves marinhos *M. edullis*. Além disso, o Se foi capaz de aumentar os níveis de GSH e a atividade da enzima GPx nas brânquias e no plasma desses animais protegendo-os contra a ação deletéria do  $\text{Cu}^{2+}$  (Trevisan *et al.*; 2010)..

### **1.7 – Danos oxidativos causados pelo Cobre**

Os danos celulares causados pelo cobre aos organismos já são bastante conhecidos, especialmente a partir da formação das ERO devido à presença de altas concentrações de metais (Figura 1). Estes metais podem causar tanto a diminuição das concentrações de GSH, como peroxidação de lipídios (Romeo & Barelli 1997). A toxicidade do cobre ou  $\text{Cu}^{2+}$ , em particular, à biomoléculas de invertebrados marinhos já foi demonstrada por vários autores (Connors & Ringwood 2000; Geret *et al.*, 2002; Nicholson 2001; Thiagarajan *et al.*, 2006). Embora o cobre seja um elemento essencial, envolvido com diversas enzimas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e manutenção dos organismos, além de suas propriedades redox (Gaetke & Chow 2003), ele se torna tóxico quando encontrado em altas concentrações no meio intracelular.

Em estudos do nosso grupo (Trevisan *et al.*; 2010) ficou demonstrado que a exposição ao cobre ( $60 \mu\text{g l}^{-1}$ ) pode causar danos ao DNA e à oxidação de tióis protéicos em hemócitos do bivalve marinho *M. edulis*. Além disso, outros trabalhos (Company *et al.* 2008; Moraga *et al.* 2005) mostram a indução de metalotioneínas e de proteínas de choque térmico (HSP).

## 2 - JUSTIFICATIVA

Embora os efeitos tóxicos do cobre sejam bem documentados para algumas espécies de invertebrados (Geret *et al.*, 2002; Nicholson 2001; Trevisan *et al.*, ), pouco ou quase nada é conhecido sobre os efeitos deste metal no mexilhão marrom *Perna perna*. Uma vez que estes animais têm sido utilizados em trabalhos de toxicologia aquática e monitoramento ambiental a fim de detectar os efeitos de contaminantes, como os metais-traço, o conhecimento prévio dos efeitos destes metais é imprescindível. Torna-se importante, então, identificar respostas bioquímicas e fisiológicas que possam ser utilizadas como biomarcadores quando da contaminação por metais, neste caso, o cobre.

Em corpos de água é frequentemente relatada a presença de compostos protetores, como o Se. Uma vez que já foi evidenciado que este composto possui ação protetora contra danos oxidativos causados por metais-traço em invertebrados marinhos (Tran *et al.*, 2007; Trevisan *et al.*, ), estudos com biomarcadores (em áreas intensamente poluídas por metais) devem levar em conta também, a presença de quantidades de Se e suas ações como protetor contra danos oxidativos causados por metais.

Desta forma, este trabalho pretende compreender melhor as respostas do sistema antioxidante de mexilhões *Perna perna* expostos ao cobre e observar se o Se têm efeito protetor nestes animais.

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivos gerais

- Investigar os efeitos da exposição aguda ao cobre e ao selênio sobre as defesas celulares e parâmetros de dano oxidativo no mexilhão marrom, *Perna Perna*.

#### 3.2- Objetivos específicos

- Determinar a  $CL_{0,96h}$  e  $CL_{50,96h}$  da exposição de *Perna perna* ao cobre a partir de uma curva de mortalidade
- Identificar os efeitos de diferentes concentrações de cobre e da exposição aguda à  $8 \mu\text{gl}^{-1}$  de selênio por 72 horas sobre:
  - a) Danos ao DNA em hemócitos do mexilhão *Perna perna*;
  - b) Níveis de glutathiona e tióis protéicos, atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo da glutathiona (glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, glutathiona-S-transferase) ou antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase e tioredoxina redutase) em tecidos do mexilhão *Perna perna*;

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – Animais e sua manutenção

Para todos os tratamentos, mexilhões *Perna perna* com tamanhos entre 6 e 8 cm foram adquiridos da Fazenda Marinha Atlântico Sul, Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC. Os animais foram levados para o laboratório onde foram mantidos em aquários (1 L de água do mar por animal), sob aeração contínua. Os animais foram alimentados a cada dois dias, e a troca da água dos aquários foi diária. Antes dos experimentos, os mexilhões foram aclimatados por ao menos uma semana. Durante os tratamentos descritos neste trabalho os animais não foram alimentados e a água do mar, tanto dos aquários dos grupos controle como dos tratados, foi trocada diariamente com reposição de cobre ou selênio, quando devido.

### 4.2- Determinação dos efeitos da exposição ao cobre

Após aclimação, foi feita uma estimativa da mortalidade para determinar a toxicidade aguda do cobre em mexilhões *P. perna*. Com os dados de dois experimentos independentes foram estimadas as concentrações letais 50% em 96 horas ( $CL_{50,96h}$ ) e a concentração subletal segura ( $CL_{0,96h}$ ) de Cu para mexilhões *P. perna*. Para tal, os animais foram divididos em grupos de 10 mexilhões por aquário e foram expostos à várias concentrações de Cu (como  $CuSO_4$ ) por 96 horas. A água dos aquários foi trocada diariamente com reposição do cobre. A cada dia os animais mortos foram retirados dos aquários, e as porcentagens de mortalidade foram determinadas para 96 horas. A curva de mortalidade foi ajustada a uma curva de decaimento de um único sítio usando-se o programa GraphPad Prisma 3.0, GraphPad Software Inc.

### **4.3- Estudo 1: Exposições ao cobre**

Os animais foram divididos em grupos de 10 e expostos a concentração nominal de 30, 60, 180 e 540  $\mu\text{g l}^{-1}$  de cobre. Ao final de 72 horas, os animais de cada grupo foram mortos, as brânquias foram dissecadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises bioquímicas subseqüentes. A hemolinfa foi extraída do músculo adutor e o teste do cometa em hemócitos foi executado imediatamente após a extração. Os tecidos restantes do animal foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises químicas, assim como alíquotas de água dos tratamentos.

### **4.4 – Estudo 2: Exposição ao selênio**

Grupos de 10 animais, após período de aclimação, foram expostos a concentração nominal de 8  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Se (como  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ ) por um período de 72 horas. Após esta exposição, os animais permaneceram por mais 72 horas sem exposição ao Se.

No 6º dia, ao final do tratamento, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados: as brânquias foram dissecadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises bioquímicas subseqüentes. A hemolinfa foi extraída do músculo adutor e centrifugada (1000 g por 3 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). O plasma livre de hemócitos foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx).

### **4.5 – Preparação das amostras**

O teste do cometa foi realizado nos hemócitos. Assim, logo após o fim dos tratamentos, a hemolinfa de cada animal foi coletada do músculo adutor separando-se as válvulas do animal com uma espátula e subtraindo-a com uma seringa de 2,5 ml. Esta hemolinfa foi mantida em gelo até ser empregada no subseqüente teste. O restante foi centrifugado (1000 g por 3 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e o plasma livre de hemócitos foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e posteriormente utilizado para o ensaio da atividade da enzima GPx.

Para a determinação dos níveis de glutathiona total e tióis não-protéicos, aproximadamente 100 mg de tecido (brânquia) foi homogeneizado em 0,9 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M, centrifugado a 15000 g por 2 minutos (4°C), e o sobrenadante (extrato ácido) foi utilizado para as determinações.

As atividades enzimáticas foram medidas no sobrenadante restante do homogenato do tecido (brânquia) em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4, centrifugado a 20000 g por 30 minutos (4°C).

#### **4.6 - Danos ao DNA pelo teste do cometa**

O teste do cometa foi realizado baseado no método de Singh e colaboradores (1988) e realizado de acordo ao descrito por Jha e colaboradores (2005), uma adaptação para hemócitos de mexilhões. Após a retirada da hemolinfa, esta foi diluída 2:3 em tampão fosfato (PBS) e, então, foi centrifugada a 400 g por 3 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células re-suspensas em agarose de baixo peso de fusão (low-melting-point; 0,75 % PBS). O material foi aplicado (70 µl), em duplicata, em lâmina microscópica já previamente revestida com agarose, em seguida cobertas com lamínula e deixados por 10 minutos a 4°C. Após este tempo, a lamínula foi retirada e as lâminas foram embebidas na solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, 1% *N*-lauril sarcosina, 1% Triton X-100, 10% DMSO, ajustado para pH 10 com 10 M NaOH) e deixadas no escuro por 2 horas. Após a lise, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese com solução tampão (0,3 M NaOH e 200 mM EDTA, pH 13) por 20 minutos, a 4°C. Então, a eletroforese foi realizada (300 mA, 25V, 20 minutos). Após a eletroforese as lâminas foram lavadas três vezes (5 minutos cada) com tampão neutralizante (0,4 M Tris/HCl, pH 7,5) e, então, foram deixadas para secar por até uma semana. Uma vez secas, as lâminas foram reidratadas com água destilada e, então, tingidas com 60 ml solução A (0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e 30 ml de solução de coloração B (0,1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,1 % AgNO<sub>3</sub>, 0,2 5% ácido tungstosílico, 0,15 % H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), soluções estas feitas separadamente e colocadas simultaneamente sobre as lâminas durante o processo de coloração. As lâminas ficaram sobre um agitador (13 g 37 °C) em solução de coloração por 35 minutos. Após este período, elas foram lavadas com água destilada e embebidas em solução de parada (1 % ácido acético glacial) por 5 minutos. Após as últimas três

lavagens com água destilada, foram deixadas para secar a temperatura ambiente. Uma vez secas, as lâminas puderam ser analisadas com a ajuda de um microscópico óptico. Os cometas foram classificados visualmente dentro de cinco categorias distintas de acordo com o tamanho/intensidade da cauda apresentada e classificadas de zero (sem dano) a 4 (dano máximo).

## **4.7 – Parâmetros Bioquímicos**

### *4.7.1 - Níveis totais de glutationa (GSH-t)*

A determinação da glutationa total (GSH-t) (GSH + GSSG, em equivalentes de GSH) deu-se a partir do método descrito por (Akerboom & Sies 1981). O ensaio enzimático foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, contendo 0,2 mM de NADPH e 0,1 mM de DTNB. O iniciador da reação é a GR (glutationa redutase) 0,25 U/ml. A quantificação de GSH-t é baseada em uma curva padrão com GSSG realizada no momento do ensaio.

### *4.7.2 - Tióis não protéicos (NPSH) e protéicos (PSH)*

Os tióis não protéicos (NPSH) e protéicos (PSH) foram mensurados a partir do método de (Ellman 1959). O extrato ácido descrito em 4.7.1 e obtido a partir de amostras de brânquia foram adicionadas ao meio de reação contendo TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1 % e DTNB 0,2 mM. O método se baseia no desenvolvimento de cor que se dá a partir da reação dos grupos tióis com o DTNB, liberando TNB. Este produto, então, pode ser mensurado espectrofotometricamente em 412 nm.

No caso de PSH, o “pellet” do extrato ácido descrito em 4.7.1, foi lavado 2-3 vezes (PCA 0,5 M) e diluído em 1 ml de TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1%. Uma alíquota da amostra foi adicionada ao meio de reação contendo TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 1% e DTNB 0,2 mM e outra foi usada como branco (contendo todos os reagentes do meio, exceto DTNB). A absorbância de uma amostra referência (branco), sem a adição de DTNB, foi descontada do valor

obtido, a fim de subtrair a interferência da turbidez causada pelo material particulado. A absorbância assim obtida foi convertida em mM com o uso do coeficiente de extinção molar do TNB ( $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), e levando em consideração as diluições da amostra.

#### 4.7.3 - *Glutathione reductase (GR)*

A atividade glutathione reductase (GR) foi determinada de acordo com (Carlberg & Mannervik 1985). Ao utilizar o substrato GSSG a enzima consome NADPH, que é acompanhado em 340 nm ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática. A reação basal de consumo de NADPH obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (GSSG) é descontada desta atividade. O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM GSSG.

#### 4.7.4 - *Glutathione peroxidase (GPx)*

A atividade da GPx, que contém uma selenocisteína em seu grupo catalítico foi acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima degrada peróxido de hidrogênio, utilizando GSH que é oxidada (GSSG) e, que por sua vez é reduzida pela GR adicionada ao meio de reação, com o consumo de NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Este consumo de NADPH é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm, similar à determinação de GR (Lawrence & Burk 1976). Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, pH 7,0, EDTA 0,5 mM contendo GSH 1 mM, GR 0,2 U/ml e NADPH 0,225 mM. Peróxido de hidrogênio (200  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como substrato, e a oxidação do NADPH foi monitorado em 340nm.

#### 4.7.5 - *Glutathione S-transferase (GST)*

A glutathione S-transferase catalisa a conjugação de GSH com o substrato 1,2-dicloro-3,4-dinitrobenzeno (CDNB), e esta conjugação pode ser detectada em 340 nm ( $\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig & Jakoby 1981). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM de CDNB.

#### 4.7.6 - *Catalase (CAT)*

A atividade catalase (CAT) foi determinada de acordo com (Aebi 1984). A atividade é determinada pela velocidade de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no primeiro minuto da reação, 240 nm ( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). No ensaio, o desaparecimento do peróxido de hidrogênio sem a presença da amostra é descontado. O ensaio enzimático de 60 segundos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,012% de Triton X-100. Como substrato iniciador utiliza-se 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

#### 4.7.7 - *Tioredoxina Redutase (TrxR)*

O ensaio é baseado na capacidade da TrxR em reduzir o DTNB a duas moléculas de TNB, levando a um aumento na absorbância em 412nm. Para descontar a formação basal de TNB através das reações dos tióis, presentes na amostra, com DTNB, as amostras foram incubadas 15 minutos em uma cubeta com tampão KPi 100 mM contendo EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e albumina de soro bovino (BSA) 0,2 mg/ml. Após este tempo, a reação específica da

TrxR é iniciada através da adição de 200  $\mu$ M de NADPH, acompanhando-se a formação de TNB em 412nm (Arner 1999).

#### 4.7.8 - Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi efetuada de acordo com o método de (Bradford 1976), usando a albumina do soro bovino como padrão. As atividades enzimáticas foram normalizadas pela quantidade de proteína total.

#### 4.7.9 - Análise estatística

A significância estatística do Estudo 1 foi determinada pela análise de variância ANOVA seguida do teste *post hoc* de Duncan quando apropriado. Para o Estudo 2, foi utilizado o teste t de Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

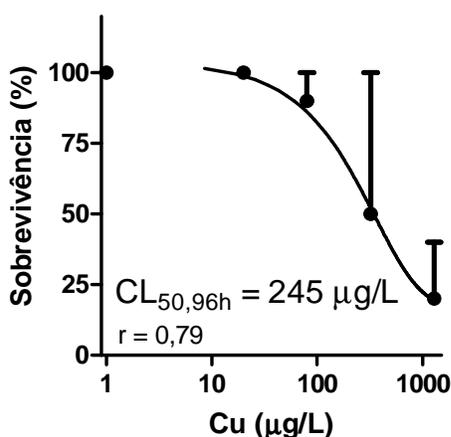
## 5 - RESULTADOS

### 5.1 – Estudo 1: Mexilhões *Perna perna* expostos ao cobre

#### 5.1.1 - Determinação da toxicidade aguda do cobre

Com o intuito de determinar a toxicidade aguda do cobre, mexilhões *P. perna* foram expostos por 96h ao cobre nas seguintes concentrações: 20, 80, 320 e 1280  $\mu\text{g l}^{-1}$ . A água dos aquários foi trocada diariamente com reposição de cobre, como descrito em Matérias e Métodos (seção 4.2). O experimento foi repetido duas vezes.

A  $CL_{50}$ , estimada com base em dois experimentos independentes foi de 245  $\mu\text{g l}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ . No primeiro teste não houve mortalidade entre os animais expostos às referidas concentrações de cobre, exceto para 1280  $\mu\text{g l}^{-1}$ , onde 60% dos animais morreram em 96 horas. No segundo teste, a mortalidade iniciou na concentração 80  $\mu\text{g l}^{-1}$ , matando 20% dos animais (Figura 2). Assim, embora indicativa, a  $CL_{50,96h}$  ainda não é conclusiva.



**Figura 2:** Análise da toxicidade aguda do cobre em mexilhões *Perna perna* expostos a várias concentrações de cobre por 96 horas. Percentagens de sobrevivência de mexilhões *Perna perna* expostos a diferentes concentrações de cobre por 96 horas.

A partir da análise da curva de mortalidade apresentada na Figura 2, percebe-se que até 80  $\mu\text{g l}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  não houve mortalidade significativa. As razões para esta enorme discrepância

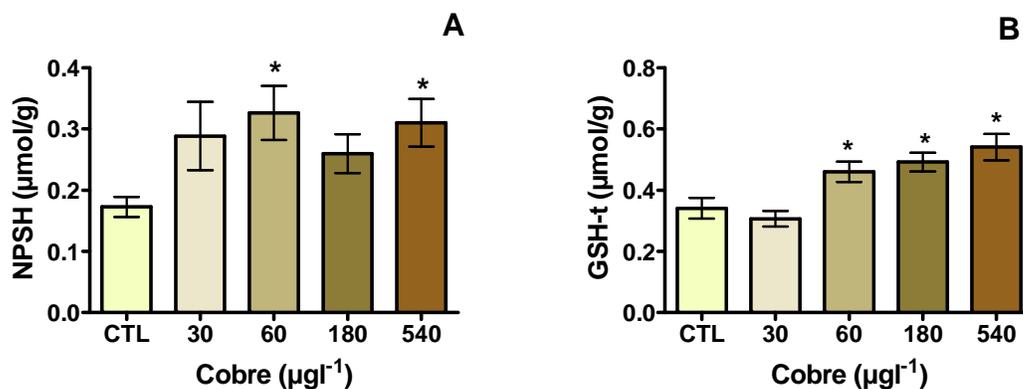
entre os dois experimentos somente poderá ser esclarecida com a ampliação do número amostral que é somente 2, entretanto para os objetivos deste trabalho, fica evidente que a concentração de  $80 \mu\text{gl}^{-1}$  não causa mortalidade significativa em 96h, podendo ser considerada com uma dose não-letal correspondente a 1/4 da  $\text{CL}_{50,96\text{h}}$ .

### 5.1.2 - Concentrações efetivas de cobre

Mexilhões *P. perna* foram expostos à quatro diferentes concentrações de cobre, 30, 60, 180 e  $540 \mu\text{gl}^{-1}$  por 72 horas conforme descrito em Materiais e Métodos (seção 4.3). Durante todo o tratamento, alíquotas de água dos aquários foram coletadas, assim como amostras de tecido, para análise dos níveis de cobre. Este material está em fase de preparação e será enviado a Universidade de Plymouth, na Inglaterra, onde será processado. Estas análises complementarão os resultados obtidos neste trabalho.

### 5.1.3 – Glutathione total (GSH-t) e tióis não protéicos em brânquias

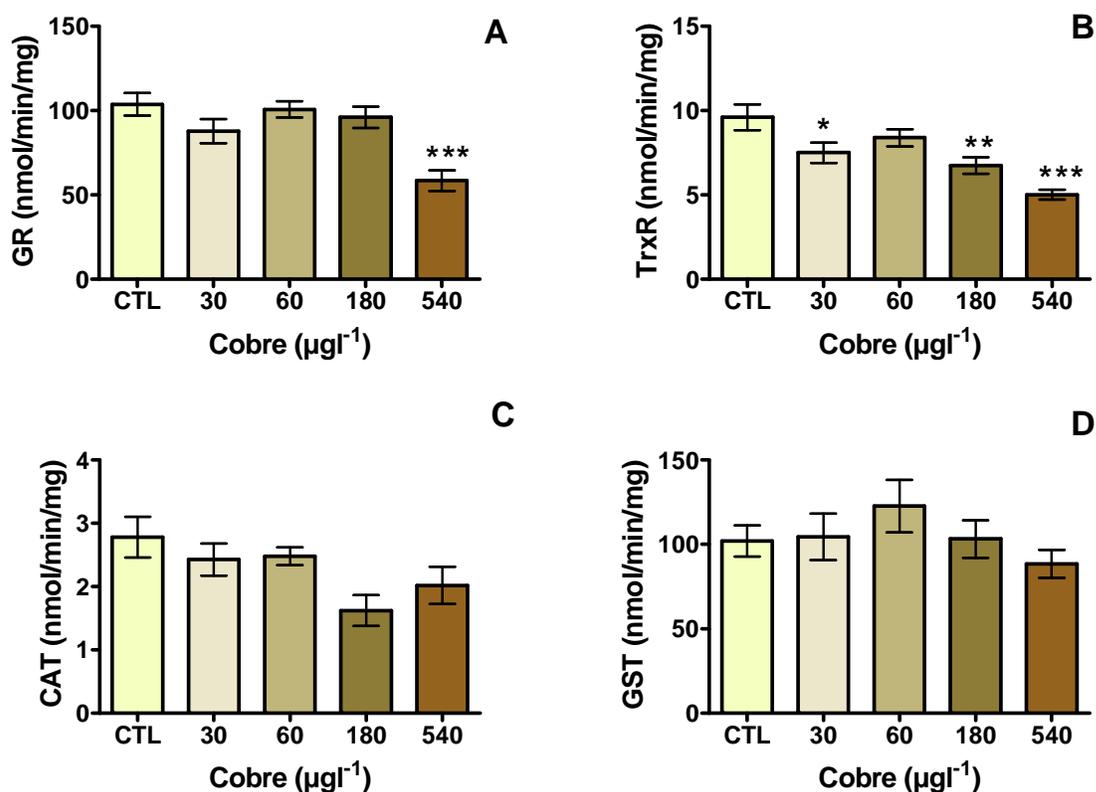
As concentrações 60 e  $540 \mu\text{gl}^{-1}$  induziram um aumento nos níveis de tióis não protéicos (NPSH) nas brânquias destes animais (Figura 3A). Os níveis de glutathione total (GSH-t) mostraram-se elevados em relação ao grupo controle para os animais expostos às concentrações de 60, 180 e  $540 \mu\text{gl}^{-1}$  de cobre (Figura 3B).



**Figura 3: Níveis tiólicos em brânquias de mexilhão *Perna perna* após 72 horas de exposição ao cobre.** (A) - Níveis de tióis não protéicos totais (NPSH); (B) Níveis de glutathiona total (GSH-t). CTL grupo controle. Análise estatística ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Duncan. Diferenças significativas expressas para  $p < 0,05$  (\*).

#### 5.1.4 – Atividade de enzimas antioxidantes

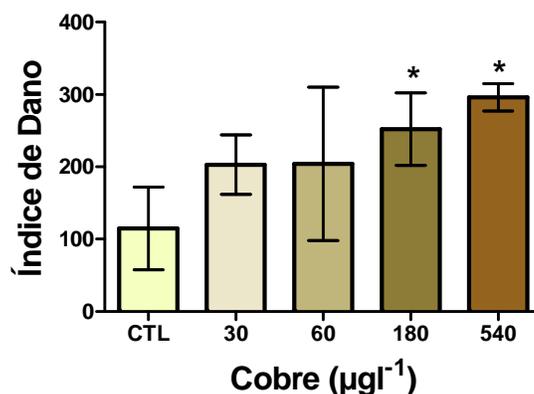
A atividade de várias enzimas foi analisada nas brânquias de *P. perna* (Figura 4), incluindo catalase (CAT), glutathiona redutase (GR), tioredoxina redutase (TrxR) e glutathiona S-transferase (GST). Todas elas podem ser consideradas enzimas de ação direta (CAT) ou indireta (GR, TrxR e GST) no sistema de defesa antioxidante. A mais alta concentração de cobre testada, 540 µg/l, induziu uma diminuição acentuada na atividade das enzimas GR (figura 4A) e TrxR (figura 4B). Para a TrxR, também foi percebida uma diminuição significativa da atividade da enzima nas concentrações 30 e 180 µg/l de cobre. Não houve diferenças na atividade da enzima GST (figura 4D), e embora tenha havido uma tendência a diminuição da atividade da enzima CAT (figura 4C), não foram encontradas diferenças significativas.



**Figura 4: Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de mexilhões *Perna perna* após 72 horas de exposição à Cu.** Atividade das enzimas: (A) glutatona redutase (GR); (B) tioredoxina redutase (TrxR); (C) catalase (CAT); e (D) glutatona S-transferase (GST) após 72 hora de exposição ao cobre. CTL grupo controle; Análise estatística ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Duncan. Diferenças significativas expressas para  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

#### 5.1.5- Dano ao DNA estimado pelo teste do cometa

O teste do cometa foi realizado nos hemócitos para observar possíveis danos oxidativos no DNA. O cobre nas duas maiores concentrações, 180 e 540  $\mu\text{g l}^{-1}$ , causou um aumento no dano ao DNA (Figura 5), como observado pelo aumento no índice de dano, o que é um indicativo de quebras de fita de DNA e sítios álcali-lábeis.



**Figura 5: Danos ao DNA mensurados pelo teste do cometa em hemócitos de mexilhão *Perna perna* após 72 horas de exposição ao cobre.** Índice de danos ao DNA é expresso em valores que variam de 0 (sem dano) a 400 (dano máximo), conforme descrito em Materiais e Métodos; CTL grupo controle; Análise estatística ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Duncan. Diferenças significativas expressas para  $p < 0,05$  (\*).

## 5.2 - Estudo 2: Exposição ao selênio

Mexilhões *Perna perna* foram tratados com  $8 \mu\text{g l}^{-1}$  selênio (Se) por 72 horas, e mantidos em água do mar sem adição de novas substâncias por mais 72 horas, como descrito em Materiais e Métodos (seção 4.4). Assim como para os tratamentos com do Estudo 1, alíquotas de água e amostras de tecido foram coletadas para análise dos níveis de Se. Este material está em fase de preparação e será enviado a Universidade de Plymouth, na Inglaterra, onde será processado e poderá complementar estes resultados.

### 5.2.1- Glutationa total (GSH-t) e tióis não protéicos em brânquias do mexilhão *Perna perna*

Após os tratamentos, os níveis tiólicos foram avaliados nas brânquias dos animais. Não houve diferenças entre os níveis de glutaciona total (GSH-t), tióis não protéicos (NPSH) e tióis protéicos (PSH) ente os grupos tratados e controle, conforme apresentado na Tabela 1.

Parâmetros	CTL	Se 8 $\mu\text{gl}^{-1}$	p
GSH-t <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,09	0,46 $\pm$ 0,1	0,72
NPSH <sup>b</sup>	0,67 $\pm$ 0,37	0,54 $\pm$ 0,23	0,37
PSH <sup>c</sup>	0,62 $\pm$ 0,33	0,62 $\pm$ 0,31	0,98

**Tabela 1: Níveis tiólicos em brânquias de mexilhão *Perna perna* expostos ao Se.**

Os animais foram expostos ao Se por 72 horas e mantidos por mais 72 horas sem adição de Se. Glutathiona total (GSH-t) expressa em  $\mu\text{mol/g}$  (<sup>a</sup>); níveis de tióis não protéicos totais (NPSH) expressos em  $\mu\text{mol/g}$  (<sup>b</sup>); tióis protéicos totais (PSH) expressos em  $\mu\text{mol/g}$  (<sup>c</sup>). Análise estatística pelo teste T de Student.

### 5.2.2- Atividade de enzimas antioxidantes

Atividades enzimáticas foram analisadas nas brânquias de *P. perna* (Tabela 2), incluindo catalase (CAT), glutathiona redutase (GR), tioredoxina redutase (TrxR) e glutathiona S-transferase (GST). A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) também foi mensurada no plasma livre de hemócitos (Materias e Métodos, seção 4.4). Não foram encontradas diferenças significativas na atividade das enzimas antioxidantes entre os grupos tratados com 8  $\mu\text{gl}^{-1}$  selênio e os animais do grupo controle. Dentre as enzimas mensuradas, a GPx foi a que demonstrou maior propensão ao aumento de atividade, porém não apresentou diferença significativa.

Parâmetros	CTL	Se 8 $\mu\text{gl}^{-1}$	p
GST <sup>a</sup>	365 $\pm$ 162	452 $\pm$ 177	0,26
GR <sup>a</sup>	77,6 $\pm$ 27,5	73,7 $\pm$ 15,9	0,70
TrxR <sup>a</sup>	5,75 $\pm$ 1,36	6,02 $\pm$ 1,54	0,70
GPx <sup>b</sup>	75,6 $\pm$ 43,1	119 $\pm$ 84,9	0,18

**Tabela 2: Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias e plasma de hemolinfa de mexilhões *Perna perna* tratado por 6 dias, sendo que os animais foram expostos nas primeiras 72 horas à 8  $\mu\text{gl}^{-1}$  Se.** <sup>a</sup> - GST, GR e TrxR dosados nas brânquias expressos em nmol/min/mg ; <sup>b</sup> - GPx dosado no plasma livre de hemócitos expressa em nmol/min/ml. Análise estatística pelo teste T de Student.

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 – Estudo 1: Mexilhões *Perna perna* expostos ao cobre

#### 6.1.1- Toxicidade aguda do cobre em mexilhões *Perna perna*

Este estudo mostrou uma estimativa da toxicidade aguda do Cu em mexilhões *P. perna*. A  $CL_{50,96h}$  estimada foi de  $245 \mu\text{gl}^{-1}$  e ficou evidente que a concentração de  $60 \mu\text{gl}^{-1}$  não causou mortalidade significativa, podendo ser considerada como uma dose não-letal correspondente a 1/4 da  $CL_{50,96h}$  (Figura 1). Estudos anteriores com *Perna viridis* (Thiagarajan *et al.*, 2006), acharam concentrações de  $CL_{50,96h}$  ( $80 \mu\text{gl}^{-1}$ ) bem abaixo daquela obtida neste estudo para *Perna perna*, bem como a concentração subletal ( $20 \mu\text{gl}^{-1}$ ).

Neste trabalho houve grande discrepância entre os dois experimentos independentes feitos a fim de se determinar a curva de letalidade do cobre (Figura 1). Um aumento no número amostral, que foi somente 2, se faz necessário a fim de esclarecer este fenômeno. Porém, a baixa mortalidade encontrada no primeiro experimento pode estar relacionada com o fechamento das valvas pelos animais na tentativa de evitar a exposição ao cobre. Este comportamento já é conhecido e descrito na literatura para esses invertebrados marinhos na tentativa de evitar o estresse (Anestis *et al.*, 2007; Hégarret *et al.*, 2007).

#### 6.1.2 - Insulto oxidativo causado por cobre em animais expostos à diferentes concentrações deste metal

Este trabalho mostrou um aumento nos níveis de GSH em animais expostos a concentrações maiores do que  $60 \mu\text{gl}^{-1}$  de cobre durante 3 dias, fato também encontrado em outros trabalhos (Al-Subiai *et al.*, 2009; Trevisan *et al.*, 2010). Al-Subiai e colaboradores (2009) mostraram a elevação nos níveis de GSH-t no músculo adutor de *M. edulis* após 5 dias de exposição à  $40 \mu\text{gl}^{-1}$  de cobre. Em trabalho paralelo, (Trevisan *et al.*, 2010) também foi possível encontrar aumento nos níveis de GSH em brânquias de *M. edulis* expostos à  $56 \mu\text{gl}^{-1}$  de cobre durante um período de 72 horas. O papel da GSH como antioxidante que age contra os efeitos

nocivos de ERO a fim de manter o balanço redox intracelular já é muito bem esclarecido (Canesi *et al.*, 1999; Meister and Anderson 1983; Sies 1989). Um aumento na quantidade deste tiol na célula tem, pelo menos, duas conseqüências: a primeira delas sendo a maior capacidade do organismo em evitar os efeitos adversos do cobre através de conjugação direta deste com a GSH. Este conjugado é estocado em lisossomos e vacúolos e posteriormente excretado (Viarengo & Nicotera 1991). Como segunda conseqüência tem-se o fato de que a GSH serve como substrato para várias enzimas antioxidantes, desta forma se ela se encontra em maior quantidade na célula, ela estará mais disponível para agir como substrato, permitindo um maior *turnover* das enzimas que a utilizam desta forma, em concordância com estudo já publicado (Trevisan *et al.*, 2010).

Por outro lado, muitos outros estudos têm demonstrado que o cobre causa uma diminuição nos níveis de GSH em mexilhões. (Doyotte *et al.*, 1997) mostraram que mexilhões de água doce *Unio tumidus* expostos a  $30 \mu\text{gl}^{-1}$  tiveram diminuição dos níveis de GSH nas brânquias e glândula digestiva. Outro estudo demonstrou que exposição ao cobre ( $60 \mu\text{gl}^{-1}$ ) por 1 a 3 semanas é capaz de diminuir os níveis de GSH-t nas brânquias e glândula digestiva de duas populações diferentes de *M. galloprovincialis* (Regoli & Principato 1995). Apesar de constatar uma diminuição dos níveis de GSH-t em *M. galloprovincialis* expostos a  $38 \mu\text{gl}^{-1}$  de cobre no período de sete dias, (Canesi *et al.*, 1999) também encontraram um aumento na atividade da  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase (GCL), enzima envolvida na síntese de GSH, indicando que mesmo quando há decréscimo nos níveis de glutatona o sistema está sinalizando para um aumento nos níveis deste tripeptídeo. Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho em conjunto, com dados da literatura, como proposto por (Trevisan *et al.*, 2010), propõe que a primeira resposta de mexilhões expostos a cobre é um aumento na síntese de GSH em resposta à exposição aguda ao cobre. Porém, se a exposição ao cobre for prolongada e o nível de estresse oxidativo induzido for alto o suficiente, uma situação oxidativa se instala e os níveis de GSH podem cair.

### 6.1.3 – Atividade das enzimas antioxidantes

Muitos estudos têm demonstrado a modulação das enzimas antioxidantes em invertebrados marinhos expostos à metais-traço (Connors & Ringwood 2000; Geret *et al.*, 2002; Nicholson 2001; Thiagarajan *et al.*, 2006). Neste trabalho, não foram encontradas alterações nas atividades das enzimas GST e CAT, embora tenha havido uma tendência a diminuição nesta última. A enzima CAT tem função primordial na prevenção da toxicidade causada por radicais hidroxila reduzindo sua formação na célula através da inibição, em torno de 30%, da reação de Fenton (Regoli 2000).

Uma diminuição acentuada foi encontrada na atividade da enzima GR dos animais expostos a mais alta concentração de cobre ( $540 \mu\text{g l}^{-1}$ ). A GR é a enzima responsável pela manutenção de GSH reduzida na célula. Se a atividade desta enzima está diminuída, a integridade celular pode estar ameaçada, uma vez que haverá menor quantidade de GSH reduzida para conjugação direta com o cobre e também para agir como substrato para as enzimas antioxidantes (Sies 1997). A diminuição da atividade da GR certamente também está relacionada com o aumento nos níveis de GSH-t. Uma vez que a capacidade de redução deste tiol está limitada, há um aumento na sua produção na tentativa de manter o balanço redox intracelular.

Algo similar ao ocorrido com a GR acontece com a enzima TrxR. Esta enzima está relacionada ao sistema Trx/Prx, responsável pela manutenção dos níveis de Trx reduzida, participando da detoxificação de peróxidos e também de outros processos enzimáticos e regulatórios (Arner & Holmgren 2000a). Apesar de o conhecimento sobre a TrxR ser ainda bastante limitado em invertebrados, já foi demonstrado o papel fundamental desta enzima no abalone *Haliotis discus discus* contra estresse físico, metais e peróxidos (De Zoysa *et al.*, 2008). Os resultados deste trabalho estão em conformidade com um trabalho anterior (Trevisan *et al.*, 2010) que mostrou uma diminuição na atividade desta enzima em *M. edulis* expostos ao cobre ( $56 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Desta forma, podemos afirmar que a redução na atividade da TrxR encontrada neste estudo pode diminuir a eficiência do sistema Trx/Prx uma vez que a taxa de redução da Trx está limitada, levando a um aumento da susceptibilidade ao dano oxidativo induzido pelo cobre.

#### 6.1.4- Danos no DNA

A exposição a 180 e 540  $\mu\text{gl}^{-1}$  de cobre causou aumento no dano ao DNA neste trabalho, o que também foi demonstrado em mexilhões *M. edulis* expostos ao cobre (56  $\mu\text{gl}^{-1}$ ) (Trevisan *et al.*, 2010). O poliqueta *Laonereis acuta* também apresentou maiores índices de dano ao DNA quando expostos à 62,5  $\mu\text{gl}^{-1}$  de cobre (Ferreira-Cravo *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou que mexilhões *M. galloprovincialis* expostos ao cobre (60  $\mu\text{gl}^{-1}$ ) por dez dias tinham maiores níveis de dano oxidativo no DNA em glândulas digestivas e hemócitos (Machella *et al.*, 2004). Neste trabalho, a exposição ao cobre levou a um desbalanço nos níveis de GSH e na atividade de enzimas antioxidantes. O mesmo processo deve estar envolvido com o maior índice de dano ao DNA encontrado por este e outros estudos.

#### 6.2 - Estudo 2: Efeito do selênio sobre as defesas antioxidantes do mexilhão *Perna perna*

O papel do Se como antioxidante já é bem demonstrado em mamíferos (El-Bayoumy 2001; Hamilton 2004; Hoffmann *et al.*, 2007), em peixes (Atencio *et al.*, 2009) e invertebrados marinhos (Tran *et al.*, 2007; Trevisan *et al.*, 2010). Estes estudos têm demonstrado que o tratamento com Se leva a um aumento na atividade de uma e/ou duas importantes selenoproteínas, a GPx e a TrxR. Mesmo assim, o mecanismo pela qual essas enzimas são reguladas ainda não está totalmente esclarecido. Foi demonstrado que mexilhões *M. edulis* submetidos à suplementação com Se (4  $\mu\text{gl}^{-1}$ ) tiveram um aumento na atividade da enzima GPx na hemolinfa e uma reversão dos danos no DNA de hemócitos induzido pelo mercúrio (Tran *et al.*, 2007), em concordância com outro trabalho do mesmo grupo (Trevisan *et al.*, 2010). Este último trabalho demonstrou que a suplementação com Se (4  $\mu\text{gl}^{-1}$ ) em *M. edulis* causa aumento na atividade da enzima antioxidante GPx, impede o decréscimo na atividade TrxR, e nos níveis de PSH, além de proteger os hemócitos contra danos no DNA.

Neste trabalho, no entanto, após mexilhões *P. perna* serem expostos à 8  $\mu\text{gl}^{-1}$  de Se durante um período de 72 horas e deixados por mais 72 horas em água do mar não tratada (Materias e métodos 4.4), em protocolo idêntico a estudos anteriores (Tran *et al.*, 2007; Trevisan *et al.*, 2010) não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos

analisados, incluindo a atividade das enzimas GPx e TrxR. Estes resultados podem estar refletindo as diferenças interespecíficas na captação, bioacumulação e efeitos do Se nas diferentes espécies de mexilhões pesquisadas por este e outros estudos.

## 7 - CONCLUSÕES

### 7.1- Estudo 1: Mexilhões *Perna perna* expostos ao cobre

Os resultados deste trabalho evidenciam que:

- a) o cobre estabelece uma condição pró oxidativa em mexilhões *Perna perna*,
- b) o cobre afeta o metabolismo da glutathiona, reduzindo a atividade de enzimas antioxidantes em brânquias e causando dano ao DNA de hemócitos de mexilhões *Perna perna*.
- c) A diminuição da atividade da TrxR nas brânquias nos animais expostos ao cobre se constitui em um importante achado.
- d) Este estudo contribuí para o melhor entendimento das defesas antioxidantes do mexilhão *Perna perna* e destacam a sua importância na área da toxicologia aquática.

### 7.2 - Estudo 2: Mexilhões *Perna perna* expostos ao selênio

Este estudo demonstrou que exposição à  $8 \mu\text{g l}^{-1}$  de Se por 72 horas:

- a) não causa alteração em uma série de enzimas antioxidantes no mexilhão *Perna perna*, incluindo as enzimas GPx e TrxR.
- b) Os resultados encontrados demonstram que há diferenças interespecíficas quanto ao efeito do Se sobre o metabolismo oxidativo entre espécies de clima temperado e subtropical.

## 7 - PERSPECTIVAS

1. Quantificar os níveis de Cu e/ou Se contidos na água coletada e nos tecidos extraídos dos animais de ambos os experimentos a fim de melhor compreender os resultados obtidos neste trabalho.
2. Testar novas concentrações de selênio em mexilhões *Perna perna* a fim de melhor entender as modulações das enzimas antioxidantes deste invertebrado.
3. Estudar o efeito da exposição aguda ao cobre e selênio e verificar se este último possui efeito protetor contra danos oxidativos em mexilhões *Perna perna*.
4. Estudar possíveis vias de sinalização celular responsáveis por respostas adaptativas ao insulto causado por metais.

## 8 – REFERÊNCIAS

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126.
- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology* 77:373-382.
- Al-Subiai SN, Jha AN, Moody AJ. 2009. Contamination of bivalve haemolymph samples by adductor muscle components: implications for biomarker studies. *Ecotoxicology* 18(3):334-42.
- Andoh T, Chock PB, Chiueh CC. 2002. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Biol Chem* 277(12):9655-60.
- Anestis A, Lazou A, Portner HO, Michaelidis B. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(2):R911-21.
- Arner ES. 1999. Superoxide production by dinitrophenyl-derivatized thioredoxin reductase--a model for the mechanism and correlation to immunostimulation by dinitrohalobenzenes. *Biofactors* 10(2-3):219-26.
- Arner ES, Holmgren A. 2000a. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267(20):6102-9.
- Arner ES, Holmgren A. 2000b. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267(20):6102-9.
- Atencio L, Moreno I, Jos A, Prieto AI, Moyano R, Blanco A, Camean AM. 2009. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Toxicon* 53(2):269-82.
- Bodnar AG. 2009. Marine invertebrates as models for aging research. *Experimental Gerontology* 44(8):477-84.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54.
- Burger J, Gaines KF, Boring CS, Stephens WL, Jr., Snodgrass J, Gochfeld M. 2001. Mercury and selenium in fish from the Savannah river: species, trophic level, and locational differences. *Environmental Research* 87(2):108-18.

- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment* 247(2-3):295-311.
- Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M, Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* 46:67-76.
- Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B. 2003. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Biochemistry* 42(33):9906-14.
- Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113:484-90.
- Chapman PM. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 44(1):7-15.
- Chen VT, Huang CL, Lee YC, Liao WC, Huang NK. 2006. The roles of the thioredoxin system and peroxiredoxins in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells. *Toxicol In Vitro* 24(6):1577-83.
- Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala-Medioni A, Camus L, Colaco A, Serrao-Santos R, Bebianno MJ. 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiulus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *Science of the Total Environment* 389(2-3):407-17.
- Connors DE, Ringwood AH. 2000. Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Toxicology* 50(4):341-349.
- Cuvin MLA, Furness RW. 1998. Uptake and Elimination of Inorganic Mercury and Selenium by minnows *Phoxinus phoxinus*. *Aquatic Toxicology*(13):205-216.
- De Zoysa M, Pushpamali WA, Whang I, Kim SJ, Lee J. 2008. Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149(4):630-9.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39:93-110.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82(1):47-95.

- Edwards JW, Edyvane KS, Boxall VA, Hamann M, Soole KL. 2001. Metal levels in seston and marine fish flesh near industrial and metropolitan centres in South Australia. *Marine Pollution Bulletin* 42(5):389-96.
- El-Bayoumy K. 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res* 475(1-2):123-39.
- Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82(1):70-7.
- Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Sandrini JZ, Amado LL, Geracitano LA, Rebelo M, Bianchini A, Monserrat JM. 2009. Antioxidant responses in different body regions of the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. *Ecotoxicol Environ Saf* 72(2):388-93.
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32(1):132-4.
- Gaetke LM, Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189(1-2):147-63.
- Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ. 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research* 54(3-5):413-7.
- Giarratano E, Duarte CA, Amin OA. 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(3):270-9.
- Habig WH, Jakoby WB. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods in Enzymology* 77:218-31.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*.: Nova York: Oxford University Press. 851 p.
- Hamilton SJ. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment* 326(1-3):1-31.
- Hardy RW, Oram LL, Moller G. 2010. Effects of dietary selenomethionine on cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) growth and reproductive performance over a life cycle. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58(1):237-45.
- Hégaret H, Wikfors GH, Shumway SE. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research* 26(2):549-559.

- Hoffmann PR, Hoge SC, Li PA, Hoffmann FW, Hashimoto AC, Berry MJ. 2007. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res* 35(12):3963-73.
- Hseu ZY. 2004. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology* 95(1):53-9.
- Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE. 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research* 586(1):47-57.
- Kehrig HA, Costa M, Moreira I, Malm O. 2002. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Marine Pollution Bulletin* 44(10):1018-23.
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71(4):952-8.
- Levinton JS. 1995. *Marine Biology – Function, Biodiversity, Ecology*. . New York: Oxford University Press 420 p.
- Machella N, Regoli F, Cambria A, Santella RM. 2004. Application of an immunoperoxidase staining method for detection of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine as a biomarker of chemical-induced oxidative stress in marine organisms. *Aquat Toxicol* 67(1):23-32.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 52:711–760.
- Mello DF. 2009. Utilização de marcadores imunológicos no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* para o monitoramento da qualidade ambiental da reserva extrativista marinha do Pirajubaé, Florianópolis/SC. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 45 p.
- Monserrat JM, Martinez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CM, Pinho GL, Chaves IS, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Bianchini A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte C: Toxicology and Pharmacology* 146(1-2):221-34.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR. 2004a. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research* 552(1-2):247-68.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR. 2004b. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res* 552(1-2):247-68.

- Moraga D, Meistertzheim AL, Tanguy-Royer S, Boutet I, Tanguy A, Donval A. 2005. Stress response in Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> exposed oysters (*Crassostrea gigas*): an immunohistochemical approach. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology* 141(2):151-6.
- Nicholson S. 2001. Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. *Chemosphere* 45(4-5):399-407.
- Ramakrishnan S, Rajesh M, Sulochana KN. 2007. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. *Indian J Ophthalmol* 55(2):95-102.
- Regoli F. 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 50(4):351-361.
- Regoli F, Orlando E. 1994. Bioavailability of biologically detoxified lead: risks arising from consumption of polluted mussels. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 3:335-8.
- Regoli F, Principato G. 1995. Glutathione, Glutathione-Dependent and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Exposed to Metals under Field and Laboratory Conditions - Implications for the Use of Biochemical Biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31(2):143-164.
- Reid TJ, 3rd, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossmann MG. 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(8):4767-71.
- Reischl E, Dafre AL, Franco JL, Wilhelm Filho D. 2007. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146(1-2):22-53.
- Romeo M, Barelli MG. 1997. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 118(1):33-37.
- Schnurstein A, Braunbeck T. 2001. Tail moment versus tail length--application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49(2):187-96.
- Sies H. 1989. [Biochemistry of thiol groups: the role of glutathione]. *Naturwissenschaften* 76(2):57-64.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82(2):291-5.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1):184-91.

- Thiagarajan R, Gopalakrishnan S, Thilagam H. 2006. Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51(3):392-9.
- Tran D, Moody AJ, Fisher AS, Foulkes ME, Jha AN. 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquatic Toxicology* 84(1):11-8.
- Trevisan R. 2008. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 63 p.
- Trevisan R, Ferraz Mello D, Fisher AS, Schuwerack PM, Dafre AL, Moody AJ. Selenium in water enhances antioxidant defenses and protects against copper-induced DNA damage in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*.
- Viana TAP. 2005. Biomarcadores e mercúrio em tubarões costeiros pescados no estado do rio de janeiro, Brasil. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 44 p.
- Viarengo A, Nicotera P. 1991. Possible role of Ca<sup>2+</sup> in heavy metal cytotoxicity. *Comp Biochem Physiol C* 100(1-2):81-4.
- Watanabe T, Kiron V, Satoh S. 1997. Trace Minerals in Fish Nutrition. *Aquaculture*(151):185-207.
- WHO WHO. 2001. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. In: Criteria EH, editor: Geneva: World Health Organization. p 238.
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606(2):135-50.

