



Laboratório de Defesas Celulares  
Departamento de Bioquímica  
Centro de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Campus David Ferreira Lima



**Defesas antioxidantes e imunocompetência em  
hemócitos da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*  
expostos ao composto clorodinitrobenzeno.**

MIRIAM ARL

Florianópolis

2014



**Defesas antioxidantes e imunocompetência em hemócitos da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* expostos ao composto clorodinitrobenzeno.**

MIRIAM ARL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. **Orientador: Dr. Rafael Trevisan (Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura), Co-orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré (Departamento de Bioquímica), Universidade Federal de Santa Catarina**

Florianópolis

2014.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação, em especial ao professor Alcir Luiz Dafre, meu co-orientador, que me acolheu no Laboratório de Defesas Celulares logo em meu primeiro ano na Universidade Federal de Santa Catarina e que sempre me apoiou e motivou durante esses quatro anos de convivência.

Aos meus companheiros do Laboratório de Defesas Celulares por me apoiarem e me ajudarem com minhas dúvidas e experimentos, e também por rirem das minhas piadas. Em especial agradeço ao meu orientador Rafael Trevisan, que sempre esteve presente me auxiliando nos experimentos e me ensinando a ser uma pesquisadora, com toda sua vontade e inspiração, e à Danielle Mello que me auxiliou muito com a parte da imunologia, sempre com muito carinho e paciência.

Aos meus amigos da universidade e da Trinda Time's, em especial à Maria Gabriela, Júlia e Meg, as quais me fazem ver que a vida é linda.

Ao meu querido Matheus pelo carinho, amor e compreensão.

Dedico este trabalho principalmente à minha família, por sempre me apoiar e me ajudar em todos esses anos longe de casa, ao meu pai Valdemar motivador dos meus estudos em biologia, que me ensinou a lutar pelo que acho correto, sendo minha inspiração para seguir sempre em frente, à minha mãe Cely por todo amor e perdão e à minha irmã Raquel que preenche meu coração de alegrias.

À UFSC e à todos os professores do curso de Ciências Biológicas pelas aulas, quase sempre motivadoras, ao programa PIBIC pela concessão da bolsa de iniciação científica e as agências financiadoras, CNPq, FAPESC e INCT-TA.



## RESUMO

O estudo do sistema antioxidante e imunológico de bivalves marinhos, tais como os da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, tem grande importância ecológica, econômica e científica. Devido a sua natureza sésil, ampla distribuição geográfica e ao seu hábito alimentar por filtração, os bivalves são recomendados como organismos modelos para trabalhos ecotoxicológicos. Para o êxito destes, é essencial se ter conhecimento a respeito da metabolização e da toxicidade de diferentes tipos de contaminantes ambientais. Neste contexto, foi investigado os efeitos do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), um composto eletrofílico capaz de afetar o sistema antioxidante, sobre a função imunológica da ostra *C. gigas*. Hemócitos foram incubados *in vitro* com CDNB (0,1 - 50  $\mu\text{M}$ ) por 1h e/ou 4h. Ensaio de viabilidade celular indicaram uma maior perda de integridade lisossomal (-25 a -53%) em ambos os tempos testados entre 2,5 e 50  $\mu\text{M}$  de CDNB, e um fraco efeito a nível mitocondrial (-30%), somente após 4 horas de incubação na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . A glutatona, uma das principais moléculas antioxidantes da célula, foi consumida (-30%) na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de CDNB em ambos os tempos testados, chegando a valores muito baixos (<10%) nas maiores concentrações (acima de 2,5  $\mu\text{M}$ ). Foi observada uma menor atividade (48-64%) das enzimas antioxidantes glutatona redutase (2,5 e 50  $\mu\text{M}$ ) e tioredoxina redutase (50  $\mu\text{M}$ ). Apesar do CDNB afetar o sistema antioxidante já em concentrações menores, a função imune (capacidade de adesão de partículas estranhas e fagocitose) foi pouco alterada. Apenas na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ) houve um aumento de 13% de hemócitos não aderidos e um decréscimo de 32% na taxa de fagocitose. A capacidade de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (“burst” oxidativo) induzido por laminarina, resposta típica da ação imunológica, foi totalmente bloqueada após exposição à CDNB 50  $\mu\text{M}$  por 1 hora. Os dados indicam que a função imunológica está preservada mesmo em cenários de baixos níveis de glutatona. A menor atividade das enzimas antioxidantes pode estar parcialmente relacionada com a perda da função dos hemócitos, uma vez que estes efeito foram predominante na maior concentração testada (50  $\mu\text{M}$ ). Os dados indicam que o mecanismo de toxicidade do CDNB pode estar associado a disfunção lisossomal, o que poderia explicar a falha em produzir o “burst” oxidativo e na capacidade fagocítica.

Palavras chave: ostra, hemócitos, sistema imunológico, defesas antioxidantes, CDNB





## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Toxicologia aquática e biomarcadores .....	11
1.2.	Bivalves marinhos e a contaminação aquática .....	11
1.3.	O sistema imune de bivalves .....	12
1.4.	A produção de ERO e o sistema antioxidante .....	13
1.5.	O uso de CDNB como agente eletrofílico modelo .....	16
2.	JUSTIFICATIVA .....	19
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1.	Objetivo geral.....	21
3.2.	Objetivos específicos .....	21
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1.	Obtenção e aclimatação dos animais.....	23
4.2.	Coleta da hemolinfa e exposição dos hemócitos ao CDNB .....	23
4.3.	Parâmetros bioquímicos e celulares .....	24
4.3.1.	Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT .....	24
4.3.2.	Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio do VN.....	24
4.3.3.	Determinação dos níveis de glutathiona total (GSH-t) .....	25
4.3.4.	Determinação dos níveis de tióis protéicos (PSH).....	25
4.3.5.	Análises enzimáticas das enzimas tioredoxina redutase (TrxR) e glutathiona redutase (GR).....	26
4.4.	Parâmetros imunológicos .....	27
4.4.1.	Taxa de adesão celular.....	27
4.4.2.	Ensaio de fagocitose .....	27
4.4.3.	Produção de ERO .....	27
5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	28
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
7.	CONCLUSÕES.....	39
8.	PESPECTIVAS .....	41
	REFERÊNCIAS .....	43



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Toxicologia aquática e biomarcadores**

Nos ambientes naturais e sob pressão antrópica, os seres vivos estão constantemente expostos a agentes estressores, dentre os quais podemos citar os contaminantes ambientais, aumento da radiação UV, reforço ou privação de nutrientes, hipóxia, perturbação do habitat e doenças infecciosas. Desse modo, a avaliação dos efeitos destes impactos provenientes das alterações ambientais requer a compreensão de diferentes níveis de hierarquia da organização biológica, desde o nível molecular, celular e tecidual, passando pelos níveis de organismos, população, comunidade e ecossistemas (RICE, 2003). Neste contexto, estudos toxicológicos utilizando células e tecidos, dos quais surgem as funções biológicas e fisiológicas, podem representar parcialmente os sistemas biológicos complexos (NOBLE; LEVIN; SCOTT, 1999). Portanto, as análises bioquímicas e celulares podem oferecer um conceito essencial para a compreensão mecanística de processos ecotoxicológicos (FENT, 2003).

Uma das formas utilizadas para a identificação do impacto de contaminantes é através da análise de biomarcadores. Estes podem ser definidos como respostas biológicas relacionadas com a exposição e a toxicidade de produtos químicos presentes no meio ambiente (PEAKALL; BURGER, 2003). Entre os principais parâmetros utilizados como biomarcadores estão: enzimas e produtos de biotransformação; parâmetros de estresse oxidativo; proteínas de estresse, metalotioneínas e proteínas que conferem resistência múltipla à drogas; parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, neuromusculares, fisiológicos, morfológicos, comportamentais e de genotoxicidade (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

### **1.2. Bivalves marinhos e a contaminação aquática**

Por serem organismos sésseis e filtradores, os bivalves marinhos estão sempre sujeitos ao estresse proveniente do ambiente, e por isso estudos a respeito dos mecanismos de defesa desses animais são importantes para trabalhos de contaminação ambiental e toxicologia aquática. Além disso, possuem ampla distribuição geográfica, capacidade de bioacumulação de poluentes e tem vida relativamente longa. Sua manipulação em laboratório é considerada fácil, sendo

resistente o suficiente para sobreviverem em laboratório assim como em estudos de campo (ZHOU *et al.*, 2008). Por fim, os bivalves marinhos são muito utilizados na maricultura, constituindo-se de uma atividade de importância social e econômica para as populações litorâneas.

De acordo com os dados de produção mundial de moluscos bivalves em 2010 foram produzidas 15 milhões de toneladas, sendo 4,5 milhões de toneladas de ostras (FAO, 2012). No Brasil foram produzidas 18.541 toneladas (MPA, 2012), neste mesmo período, sendo 15.635 toneladas produzidas em Santa Catarina. Desta forma, o estado se destaca no cenário da maricultura nacional, sendo responsável por mais de 80% da produção de moluscos bivalves do país. Atualmente o estado de Santa Catarina é o maior produtor de ostras do Brasil, terminando 2013 com 2.932,5 toneladas produzidas, com destaque para Florianópolis, onde destacam-se os cultivos de mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* (CURTIUS *et al.*, 2003) sendo o maior produtor de ostras a nível nacional com 70% da produção (EPAGRI, 2013).

A ostra *C. gigas*, modelo nesse estudo, vive em regiões estuarinas e entremarés até 40 metros de profundidade, constantemente enfrentando desafios relacionados à diferença de salinidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio (FAO, 2005). Possuem uma notável defesa contra a predação e dessecação, formando conchas calcificadas grossas, uma inovação evolucionária chave. Devido a sua metamorfose, representam um modelo interessante para a biologia do desenvolvimento (BRUSCA; BRUSCA, 2003). Além disso, a ostra *C. gigas* teve seu genoma completo sequenciado recentemente, o que facilita estudos moleculares (ZHANG *et al.*, 2012).

### **1.3. O sistema imune de bivalves**

A resposta imune de invertebrados depende de um sistema não adaptativo com base em componentes celulares e humorais, os quais interagem a fim de defender o organismo contra invasores. Entretanto, esses componentes também são considerados sensíveis ao estresse ambiental, incluindo a exposição a contaminantes (MUROGA; TAKAHASHI, 2007) e outros fatores bióticos e abióticos. Mesmo sem um sistema imune adaptativo, como o dos vertebrados, esses animais possuem mecanismos eficazes de defesa com base em uma complexa interação entre as respostas de defesas celulares e humorais presentes no

fluido celular circulante do corpo desses animais, o qual é chamado de hemolinfa.

O sistema imune celular depende das células imunocompetentes, chamadas hemócitos, responsáveis por desencadear uma série de reações imunitárias essenciais para a sobrevivência do animal no meio ambiente (PIPE; COLES, 1995). Dois tipos de hemócitos são comumente reconhecidos: granulócitos e hialinócitos, diferenciados pela presença de grânulos citoplasmáticos ou não, respectivamente. Essas células são responsáveis por processos inflamatórios, reparo de feridas, fagocitose e encapsulamento de partículas externas, sendo que os granulócitos tendem a ser mais fagocíticos e tem maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) do que os hialinócitos (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a). A hemolinfa também contém componentes humorais, incluindo peptídeos antimicrobianos (SALZET, 2001), aglutininas (OLAFSEN; FLETCHER; GRANT, 1992) e lisozimas (XUE *et al.*, 2004). Esses componentes tem a função de promover a opsonização, o que facilita a agregação e imobilização bacteriana, e/ou apresentar atividades citolítica. Desse modo, a ação combinada dos fatores de defesa humorais e o processo de fagocitose nos hemócitos contribuem para a homeostase destes organismos (CANESI *et al.*, 2002a; LABREUCHE *et al.*, 2006).

Os hemócitos, através de proteínas de membrana, são capazes de realizar o reconhecimento de diversos tipos de patógenos, promovendo sua aderência através de integrinas (BEUTLER, 2004; TERAHARA *et al.*, 2006). Após o reconhecimento e adesão, ocorre a projeção da membrana do hemócito no local da adesão, seguida da internalização (ou endocitose) do patógeno em uma vesícula chamada vacuolo fagocítico. Os eventos subsequentes dependem da atividade de grânulos lisossomais que se fundem ao mesmo, formando um fagolisossomo, iniciando assim a morte e digestão intracelular das bactérias (CANESI *et al.*, 2002b) através da geração de ERO (ADEMA *et al.*, 1991), de óxido nítrico (LAMBERT *et al.*, 2007) e digestão enzimática (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a).

#### **1.4. A produção de ERO e o sistema antioxidante**

Conforme comentado anteriormente, as células fagocíticas de muitas espécies de bivalves podem ser ativadas por partículas estranhas oriundas de organismos invasores, e após a fagocitose dos mesmos atua liberando produtos químicos oxidantes. Esta resposta é muitas vezes

referida como um "burst" oxidativo, característico em mamíferos e que vem sendo alvo de estudos em bivalves. A base bioquímica para o "burst" oxidativo é a ativação da proteína de membrana da NADPH oxidase (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase) (PIPE, 1992), associada às membranas celulares externas da célula, dos vacúolos fagocíticos e do lisossomo (DONAGHY *et al.*, 2012). A mesma transfere elétrons do citosol para dentro do vacúolo, o qual é aceito pelo oxigênio ( $O_2$ ). Neste sistema, o metabólito inicial dessa reação é o anion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que pode ser convertido espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) à peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual pode ser convertido em outras ERO tóxicas, tais como o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (DONAGHY *et al.*, 2015). É geralmente aceito que este sistema promove a morte microbiana por meio da geração de ERO e da atividade da enzima mieloperoxidase em mamíferos (SEGAL, 2008). O peróxido de hidrogênio também interage com a enzima mieloperoxidase, que na presença de cloro produz o ácido hipocloroso (HOCl), o qual também possui ação microbicida. Todos esses metabólitos desempenham um papel importante na morte de microorganismos mediada pela fagocitose (ADEMA *et al.*, 1991; BUGGÉ *et al.*, 2007).

Além de atuar como potentes microbicidas, as ERO também podem causar danos e distúrbios durante o metabolismo celular. Se o aumento nos níveis de ERO for relativamente pequeno, a resposta antioxidante pode ser suficiente para compensar o aumento das mesmas e repor o equilíbrio original entre a produção de ERO e capacidade de eliminação de ERO. Se os níveis das ERO não forem controlados poderá ocorrer um acúmulo de danos oxidativos a biomoléculas, tais como, peroxidação de lípidos, proteínas e DNA, e muitas vezes uma perturbação geral do equilíbrio redox celular (ABELE; PUNTARULO, 2004). Por exemplo, ERO podem afetar o grupamento SH presente nas cisteínas de proteínas (PSH), importantes estruturas para os processos de defesa celular e regulação metabólica.

Assim manifestações fisiológicas da regulação redox envolvem uma mudança temporária no estado reduzido ou oxidado de tióis intracelulares, proteicos ou não. A longo prazo, esses mecanismos podem tanto manter um condição estável chamado de homeostase redox, ou então causar situações patológicas originadas a partir do estresse e dano oxidativo, podendo causar a morte celular (DRÖGE, 2002).

Os grupamentos SH podem participar diretamente na neutralização de ERO, e de processos de regulação redox celular sendo sensíveis ao

balanço entre agentes oxidantes e redutores celulares (JONES, 2008). Neste contexto, as cisteínas de proteínas podem ser oxidadas a diferentes formas, afetando a estrutura da molécula e consequentemente sua função biológica.

Para evitar ou reparar os danos oxidativos existe o sistema antioxidante, composto por vários componentes responsáveis pela neutralização dessas moléculas (WINSTON; DI GIULIO, 1991). Os antioxidantes são qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Este sistema é formado por enzimas e por pequenas moléculas antioxidantes não-proteicas, tais como a glutatona (GSH), vitaminas E, A e C, urato e, biliverdina (WINSTON; DI GIULIO, 1991).

Um fator importante para a defesa celular é presença da GSH, um tripeptídeo composto por gama-glutamil-cisteinil-glicina, o qual atua contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos (TATE; MEISTER, 1981). Sua capacidade antioxidante se dá pelo grupamento tiol (SH) reativo de sua cisteína, o qual através da enzima glutatona-S-transferase (GST) é conjugado com o agente eletrofílico, formando um conjugado de glutatona. Este mesmo grupamento SH é responsável por doar elétrons para o sistema de degradação de peróxidos da glutatona peroxidase. Durante a ação catalítica desta enzima, peróxidos orgânicos ou de hidrogênio são reduzidos a seus respectivos álcoois ou água com auxílio da GSH, prevenindo a ação oxidante destas moléculas. Neste e outros processos oxidativos celulares, a GSH é transformada a dissulfeto de glutatona (GSSG), também conhecida como glutatona oxidada. Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutatona redutase (GR) reduz a GSSG às custas de NADPH através dos grupos SH presentes em seu sítio ativo. Dessa forma, ocorre a regeneração contínua da GSH, mantendo o estado redox intracelular (TOLEDANO *et al.*, 2013). A proporção de glutatona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) encontrada em níveis fisiológicos normais em mamíferos é mantido na ordem de 100/1 (FILOMENI; ROTILIO; CIRIOLO, 2002).

Entre as demais enzimas antioxidantes podemos citar a superóxido dismutase (SOD), responsável por converter o ânion superóxido em  $H_2O_2$ ; a catalase (CAT) por converter o  $H_2O_2$  em água e oxigênio; e as peroxidoredoxinas, que de maneira semelhante a glutatona peroxidase, são responsáveis por reduzir peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos

em água ou seus respectivos álcoois ou água (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Outro importante mecanismo de defesa antioxidante é composto pela tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase (TrxR). A Trx é uma importante proteína dissulfeto redutase, podendo servir como doadora de elétrons para enzimas como as ribonucleotídeo redutases e as peroxirredoxinas. Neste último caso, os grupos tiólicos (SH) de suas duas cisteínas são oxidadas para a forma dissulfeto (S-S) no processo. A enzima TrxR é capaz de realizar a redução desse grupo S-S através de sua selenocisteína e cisteína presentes no sítio catalítico, os quais formam dissulfetos intermoleculares com a Trx, seguido da transferência de elétrons com auxílio do NADPH. Dessa forma, a TrxR é responsável por catalisar a redução contínua da Trx, também auxiliando na manutenção do estado redox celular (LU; HOLMGREN, 2014; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

### 1.5. O uso de CDNB como agente eletrofílico modelo

O 1-cloro-2,4-dinitrobenzo (CDNB) é um composto eletrofílico usado como agente depletor dos grupamentos SH. Ele é utilizado como substrato universal para a enzima GST, formando irreversivelmente um conjugado de CDNB com GSH, o 2,4-dinitrofenil-glutationa (DIAH *et al.*, 1999). Desta forma, ocorre um aumento no tamanho da molécula e também em sua hidrofiliicidade, facilitando sua excreção. Para tal, inicia-se a via do ácido mercaptúrico: primeiro são removidos os resíduos de glutamato e glicina do conjugado de glutaciona, seguido da acetilação do conjugado de cisteína restante formando um ácido mercaptúrico. Esse é o principal metabólito excretado pelo organismo através dessa via (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974). Desta forma, o CDNB pode ser utilizado como um composto modelo para investigar mecanismos envolvendo o consumo de glutaciona e o metabolismo de seus conjugados.

Além disso, em mamíferos já foi caracterizado *in vitro* que o CDNB atua nas cisteínas do sítio ativo das enzimas GR e TrxR, inibindo-as irreversivelmente (ARNÉR; BJÖRNSTEDT; HOLMGREN, 1995). Em bivalves o CDNB foi capaz de inibir *in vivo* as enzimas antioxidantes GR e TrxR em mexilhões *P. perna* e em ostras *C. gigas*, além do consumo de GSH, moléculas indispensáveis para a homeostase celular. Esse processo aumentou a susceptibilidade dos organismos (inclusive dos hemócitos) a agentes oxidantes e, consequentemente, levou ao



acúmulo de danos celulares e distúrbios fisiológicos (TREVISAN *et al.*, 2012, 2014).

O sistema antioxidante tem sido utilizado como alvo de estudos de biomonitoramento ambiental, a fim de compreender os efeitos de contaminantes em organismos aquáticos. Diferentes poluentes podem atuar de maneira eletrofílica (semelhante ao CDNB), tais como quinonas e aldeídos (STAIMER *et al.*, 2012), podendo afetar o sistema antioxidante, promovendo eventos oxidativos e desestabilizando a homeostase celular (DOYOTTE *et al.*, 1997; FRANCO *et al.*, 2010; HANSEN *et al.*, 2006).



## 2. JUSTIFICATIVA

Em bivalves, poucos estudos têm analisado a relação e dependência entre os sistemas antioxidante e imunológico, apesar da evidente relação entre ambos durante o combate contra microrganismos invasores. Sabendo que contaminantes ambientais podem afetar um ou ambos os sistemas, é fundamental compreender essa relação para melhor caracterizar a toxicidades dos diferentes contaminantes. Já foi demonstrado que o CDNB é capaz de inibir a enzima TrxR em mamíferos (ARNÉR; BJÖRNSTEDT; HOLMGREN, 1995). Em outros estudos do nosso grupo de pesquisa, foi observado que uma exposição *in vivo* ao CDNB também é capaz de inibir enzimas antioxidantes em brânquia de mexilhões *Perna perna* (TREVISAN *et al.*, 2014) e ostras *C. gigas* (TREVISAN *et al.*, 2012), além de depletar os níveis de GSH. Nesse estudo com *C. gigas* a viabilidade celular dos hemócitos também foi afetada, o que motivou a investigar *in vitro* se o CDNB também seria capaz de afetar a imunocompetência nessas células. Dessa forma, este composto pode ser utilizado como modelo para análise da importância das enzimas antioxidantes para o funcionamento de hemócitos de bivalves. Esta ferramenta permitirá observar se a inibição do sistema antioxidante pode interferir na função imune de hemócitos de bivalves.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar se a influência do CDNB no sistema antioxidante pode influenciar na função imune dos hemócitos de ostras *C. gigas*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Analisar o efeito do CDNB sobre hemócitos através:
  - de ensaios de viabilidade celular (vermelho neutro e MTT)
  - da análise das enzimas TrxR e GR e dos níveis de glutatona total (GSH-t) e tióis proteicos (PSH)
  
- Analisar se a inibição do sistema antioxidante pode interferir nos parâmetros imunológicos em hemócitos de *C. gigas* através da análise da taxa de adesão, fagocitose e geração de ERO.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção e aclimação dos animais

Ostras *C. gigas* foram obtidas de uma fazenda de cultivo localizada no bairro Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC, e aclimatadas em laboratório por ao menos uma semana antes da realização dos experimentos. As ostras foram acondicionadas em aquários de 12 L, com 1 L de água do mar por animal (salinidade 33‰) a 18-20°C. A água foi trocada a cada dois dias e os animais alimentados com uma mistura comercial de extrato de fitoplâncton (Sera Coraliquid, Alemanha) após cada troca de água.

### 4.2. Coleta da hemolinfa e exposição dos hemócitos ao CDNB

A hemolinfa dos animais foi extraída a partir do músculo adutor com seringas de 1 mL. Para acessar o músculo adutor, uma pequena parte da concha foi quebrada com um alicate. Em todo o período que antecede os tratamentos *in vitro*, os hemócitos foram armazenados em tubos de plástico e mantidos no gelo. Cada amostra coletada foi conferida em microscópio para verificar a sua qualidade, as amostras contendo parasitas, gametas ou aglutinação de hemócitos foram descartadas. Em seguida, foi realizada a contagem de hemócitos totais através de uma câmara de Neubauer *Improved*.

Para cada “pool” ou amostra foram utilizados no mínimo 3 animais, visto que cada teste realizado necessitava de uma quantidade diferente de hemócitos e a densidade celular desses animais é aproximadamente 3 milhões de células por mL. A hemolinfa contendo o número hemócitos necessários para cada análise (conforme descrito nas subseções 4.3 e 4.4) foi centrifugada (400 x g por 10 minutos a 4° C) e o sobrenadante (plasma) descartado. Os hemócitos foram suspensos em tampão fosfato salina marinho (PBS marinho, contendo 400 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) para obter uma concentração final de 1 milhão de células por mililitro. Os hemócitos foram incubados com CDNB (Sigma) (0,1 – 50 µM, preparado em água do mar filtrada) ou com água do mar filtrada (CDNB 0 µM, grupo controle). Todos os grupos foram ajustados para conter a mesma concentração de etanol (0,05%), o qual foi utilizado para dissolver o CDNB. As suspensões de células foram incubadas no escuro em banho maria a 20°C.

Após 1 ou 4 h de incubação as amostras foram centrifugadas a 800 x g, 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas pela adição de 0,5 mL de PBS marinho. A centrifugação foi repetida e o sobrenadante novamente descartado. Este procedimento permitiu a lavagem para remoção do CDNB extracelular. O sedimento contendo os hemócitos foi utilizado para a realização dos diferentes ensaios, conforme descritos a seguir.

### **4.3. Parâmetros bioquímicos e celulares**

#### **4.3.1. Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT**

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria por desidrogenases a um produto chamado formazan. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado (MOSMANN, 1983).

As amostras contendo 1 milhão de hemócitos previamente tratados com CDNB foram suspensas em 300 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL preparado em PBS marinho. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 h no escuro a 25 °C e centrifugadas a 800 x g por 2 minutos a 4° C. O formazan gerado foi extraído das células pela adição de 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) seguida da incubação a 25°C durante 15 minutos. A absorbância foi lida em 550 nm em espectrofotômetro (MELLO *et al.*, 2012).

#### **4.3.2. Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio do VN**

O ensaio do vermelho neutro baseia-se na capacidade de células viáveis em incorporar o corante vermelho neutro. Esse corante fracamente catiônico penetra nas membranas celulares por difusão passiva não-iônica e concentra-se nos lisossomos, onde se liga através de ligações hidrofóbicas eletrostáticas a ânions e/ou grupos fosfato da matriz lisossomal (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Amostras contendo 400.000 hemócitos previamente tratados com CDNB foram suspensas em 150 µL da solução de vermelho neutro 0,004% preparado em PBS marinho. A incubação foi realizada durante 3 h no escuro a 25 °C. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas e lavadas com PBS marinho, como descrito no item 4.3.3. Em seguida



foram suspensas em 200  $\mu$ L de álcool acidificado (50 % etanol, 1 % ácido acético), deixadas no escuro por 15 minutos e lidas em 560 nm em espectrofotômetro (MELLO *et al.*, 2012).

#### **4.3.3. Determinação dos níveis de glutathiona total (GSH-t)**

Após o tratamento com CDNB, as células (1,5 milhão) foram acidificadas com 50  $\mu$ L de ácido perclórico (PCA) 0,5 M. Em seguida, os tubos contendo as células foram agitados em aparelho tipo vórtex e deixados no gelo por cinco minutos, seguido de nova agitação, em um total de três ciclos. Este procedimento serve para romper as células e precipitar as proteínas. As amostras foram neutralizadas com diferentes volumes de KOH 2 M contendo MOPS 0,3 M até atingir o pH 7, utilizando fitas de pH para conferência. Em seguida foi realizada uma centrifugação rápida de 15.000 x g por 2 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para medir a GSH-t e o sedimento foi guardado para a realização do ensaio de PSH.

A determinação da GSH-t (a soma das formas reduzida e oxidada da glutathiona) é baseada na liberação do ácido tionitrobenzóico (TNB) durante a reação entre GSH e ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB). Este ensaio utiliza a regeneração enzimática contínua da GSH por um sistema acoplado com GR e NADPH. A GSH, presente inicialmente ou formada enzimaticamente a partir da GSSG, reage com o (DTNB), formando um conjugado. Este pode ser reduzido pela GR, gerando uma nova GSH para recomençar o ciclo e uma molécula de TNB, a qual é quantificada no ensaio (TIETZE, 1969). O método é realizado espectrofotometricamente a 25°C com leitura em 412 nm, utilizando um tampão contendo fosfato de potássio (KPi) 100 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NADPH 0,225 mM e DTNB 0,1 M. Como substrato iniciador utilizou-se GR 0,25 U/ml.

#### **4.3.4. Determinação dos níveis de tióis protéicos (PSH)**

A fração particulada obtida conforme o item anterior (4.3.3) foi lavada com 250  $\mu$ L de PCA 0,5 M e em seguida novamente centrifugada a 15.000 x g por 2 minutos a 4°C. O pellet foi suspenso em 100  $\mu$ L de tampão tris-hidroximetilaminometano (Tris/HCl) 0,5 M pH 8,0 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e DTNB 0,25 mM. Após 30 minutos de incubação, as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 412 nm a fim de quantificar o TNB liberado a partir da reação do DTNB com os grupos de tióis livres presentes nas

proteínas, utilizando o coeficiente de extinção molar do TNB de  $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (JOCELYN, 1987).

#### **4.3.5. Análises enzimáticas das enzimas tioredoxina redutase (TrxR) e glutatona redutase (GR)**

Amostras contendo 10 milhões de hemócitos previamente tratados com CDNB foram suspensas em 50  $\mu\text{L}$  de HEPES 20 mM, pH 7 contendo CHAPS 1%. Em seguida, foram agitadas em aparelho tipo vórtex por 30 segundos e deixadas no gelo, em um total de 3 ciclos. Posteriormente foi realizada uma centrifugação de  $20.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , para a utilização do sobrenadante na realização dos ensaios.

O ensaio enzimático para GR determina o consumo de NADPH quando adicionado ao meio o substrato GSSG, sendo que a velocidade do consumo de NADPH em condições de saturação expressa a atividade enzimática. O ensaio foi realizado em tampão KPi 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e 0,225 mM de NADPH. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM de glutatona oxidada (GSSG). A atividade da GR foi acompanhada a  $25^\circ\text{C}$  em 340 nm por meio espectrofotométrico. A reação cinética foi realizada por 30 minutos, devido à baixa atividade enzimática nessas células. Foi descontada a atividade basal de consumo do NADPH sem a adição de GSSG (CARLBERG; MANNERVIK, 1985).

A atividade da TrxR é determinada pela análise da redução do DTNB a duas moléculas de TNB na presença de NADPH, causando um aumento na absorvância em 412 nm. As amostras foram previamente incubadas por 20 minutos em tampão KPi 100 mM pH 7,0 contendo EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e albumina de soro bovino (BSA) 0,2 mg/mL. Esse tempo foi necessário para permitir a reação inespecífica do DTNB com tíois proteicos, a qual também gera TNB interferindo no método. Após esse período a reação específica da TrxR é iniciada através da adição de NADPH 0,2 mM e ensaiada por 30 minutos. A atividade basal foi descontada através do ensaio na ausência de NADPH (ARNER; ZHONG; HOLMGREN, 1999).

## 4.4. Parâmetros imunológicos

### 4.4.1. Taxa de adesão celular

As amostras contendo 500.000 hemócitos previamente tratados ou não com CDNB foram suspensas em 200 µL de água do mar filtrada (AMF) e adicionadas em uma placa de 24 poços estéril. As células foram incubadas por 1 h a 18°C e, em seguida, o sobrenadante foi removido e fixado em PBS/formol 4%. A contagem dos hemócitos não aderidos (sobrenadante) foi realizada em microscópio, em câmara de Neubauer *Improved*, e a quantidade comparada com a densidade celular inicial. (TERAHARA; TAKAHASHI; MORI, 2005).

### 4.4.2. Ensaio de fagocitose

Amostras contendo 250.000 hemócitos previamente tratados ou não com CDNB foram suspensas em 250 µL de plasma filtrado e estéril e incubadas com microesferas de látex fluorescentes (1 hemócito: 500 microesferas) na concentração 0,05% (0,22 µm, Polysciences) durante 1 hora a 18°C em tubos de citômetro (BD Biosciences). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) através do canal FIT-C. A porcentagem de células fagocítica foi definida como a das células que fagocitaram três ou mais microesferas. (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a, 2003b).

### 4.4.3. Produção de ERO

Amostras contendo 250.000 hemócitos previamente tratados ou não com CDNB foram suspensas em 250 µL de AMF ou AMF contendo laminarina a 2 mg/mL. (Calbiochem, β-1,3-glicanas *Laminaria digitata*). A laminarina foi utilizada como indutor de “burst” oxidativo. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) 50 µM (Sigma) e realizada uma incubação por 30 minutos a 18 °C para a quantificação dos níveis de ERO. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) através do canal FIT-C. (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003a, 2003b). A produção de ERO foi detectada através da oxidação de DCFH à DCF em amostras estimuladas ou não, e calculada através da média geométrica da intensidade de fluorescência (GOEDKEN; DE GUISE, 2004).

#### **4.5. Análises estatísticas**

Foram realizados testes de normalidade e análises de variância (ANOVA) de uma via com dados pareados, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey ou ANOVA de duas vias com dados pareados seguidas pelo teste *post hoc* de Bonferroni, quando apropriado. Os dados são apresentados como média e erro padrão, utilizando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

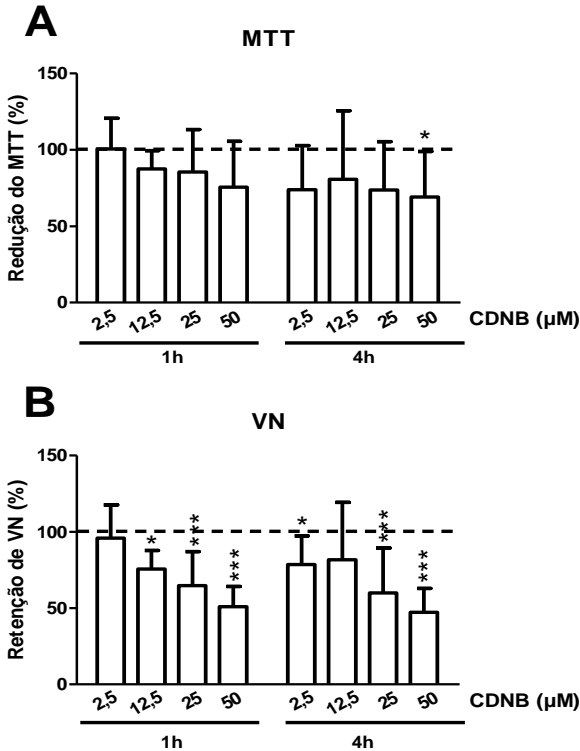
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos *in vivo* com CDNB demonstraram a toxicidade desse composto para ostras *C. gigas* e mexilhões *P. perna*, afetando também a viabilidade celular de hemócitos (TREVISAN *et al.*, 2012, 2014). No presente trabalho, foi investigado o efeito do CDNB *in vitro* sobre o sistema antioxidante e imunológico de hemócitos da ostra *C. gigas*. Para definir as concentrações e tempos de exposição a serem utilizados, assim como o grau de toxicidade deste composto, foram realizados inicialmente ensaios de viabilidade celular à nível mitocondrial (redução do MTT) e estabilidade lisossomal (teste de retenção do vermelho neutro). O CDNB não afetou a capacidade de redução do MTT após 1 hora de exposição em nenhuma das concentrações testadas (2,5 - 50  $\mu\text{M}$ ), enquanto que após 4 horas de exposição afetou em média 30% somente na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 1A). Estes dados sugerem que a mitocôndria pode estar íntegra e consegue manter suas atividades em níveis normais na maior parte das concentrações de CDNB testadas, possivelmente não afetando a homeostase celular.

Uma vez que lisossomos acumulam uma grande quantidade de contaminantes ambientais em bivalves, a estabilidade dessa organela é um importante parâmetro de viabilidade celular, podendo ser avaliada através do teste de retenção vermelho neutro. Perda da capacidade de retenção do vermelho neutro pode refletir eventos de toxicidade celular envolvendo esta organela, indicando o estado de saúde do animal (ALLEN; MOORE, 2004). Após a exposição ao CDNB, a integridade lisossomal foi afetada em ambos os tempos de exposição (-25% à -53%), onde ocorreu uma diminuição de maneira mais expressiva na retenção do vermelho neutro nas duas maiores concentrações (25 - 50  $\mu\text{M}$ ) e nos dois tempos testados (1 e 4 h) (Fig. 1B).

Hemócitos de ostras *C. gigas* expostas *in vivo* ao CDNB 10  $\mu\text{M}$  por 18h, revelaram que este composto sozinho não afetou a viabilidade mitocondrial ou lisossomal dos hemócitos. Entretanto, quando os animais foram expostos ao CDNB, seguido da exposição a um agente pró-oxidante (menadiona), a viabilidade mitocondrial se manteve inalterada, enquanto que a estabilidade lisossomal foi fortemente diminuída (TREVISAN *et al.*, 2012). Estes dados indicam a sensibilidade desta organela a estressores químicos, incluindo o CDNB, em situações onde os animais estejam sofrendo um estresse adicional. Em outro trabalho, mexilhões *P. perna* foram expostos *in vivo* a CDNB 10  $\mu\text{M}$ , a fim de investigar se a inibição parcial do sistema antioxidante pelo CDNB poderia aumentar a toxicidade do peróxido de cumeno

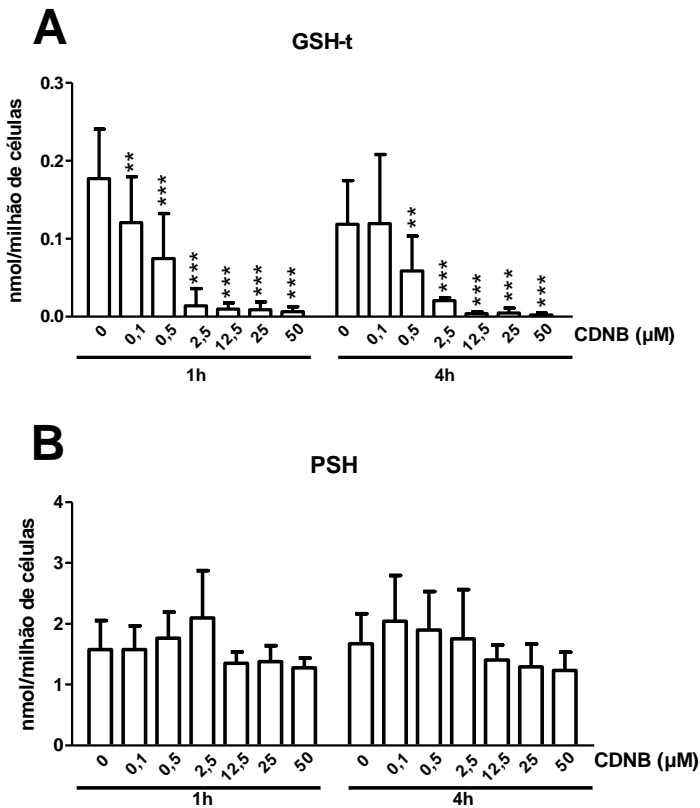
(TREVISAN *et al.*, 2014), a viabilidade mitocondrial (redução do MTT) dos hemócitos foi afetada somente após a exposição combinada de CDNB seguido de peróxido de cumeno (100  $\mu$ M). Isso ressalta a importância da utilização de ensaios de viabilidade celular em paralelo para garantir uma melhor compreensão, visto que a mitocôndria e o lisossomo podem ser diferentemente sensíveis a compostos tóxicos.



**Figura 1. Viabilidade celular de hemócitos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostos in vitro a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1 h ou 4 h. (A)** Ensaio de redução do tetrazólio MTT, indicando atividade mitocondrial, e (B) teste do vermelho neutro (VN), representando integridade da membrana lisossomal. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle, representado pela linha pontilhada (100%) como média e erro padrão médio (n= 6-12). Os dados foram analisados por ANOVA pareada de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Sabendo que o CDNB é capaz de afetar algumas das defesas antioxidantes celulares (TREVISAN *et al.*, 2012, 2014), e a fim de investigar se esses efeitos poderiam estar relacionados com as alterações na viabilidade celular, foram analisados os níveis de tióis intracelulares após 1 e 4 horas de exposição ao CDNB. Foi possível observar que, conforme o aumento da concentração de CDNB, as células apresentaram menores níveis de GSH-t (Fig. 2A). Até mesmo em concentrações de CDNB mais baixas que as utilizadas para os ensaios de viabilidade celular (0,1 e 0,5  $\mu\text{M}$ ) ocorreu uma diminuição entre 30 e 60% nos níveis de GSH-t, sendo que a partir de 2,5  $\mu\text{M}$  foi consumida mais de 90% da GSH-t. Esta diminuição nos níveis de GSH-t não afeta a viabilidade celular nem a função lisossomal, somente na concentração mais alta de CDNB (50  $\mu\text{M}$ ) estes parâmetros foram afetados. Os níveis de tióis proteicos não foram alterados em nenhum tempo e em nenhuma concentração testadas.

Em brânquias da ostra *C. gigas* expostas *in vivo* ao CDNB 10  $\mu\text{M}$  por 18 horas, também foi possível encontrar uma resposta semelhante, onde aproximadamente 50% da GSH-t foi consumida e os níveis de tióis protéicos (PSH) também apresentaram uma pequena diminuição (TREVISAN *et al.*, 2012). Em contraste, mexilhões expostos *in vivo* a CDNB foi observado somente uma diminuição nos níveis de GSH-t e não nos níveis de PSH. Esse último padrão de resposta se repetiu nos hemócitos *in vitro*, pois o PSH não foi alterado após a exposição em nenhuma concentração de CDNB (Fig. 2B). No presente trabalho, apesar da glutathiona apresentar níveis basais mais baixos que o PSH (0,1 contra 1,5 nmol/milhão de células), ela mostrou uma maior reatividade com CDNB, possivelmente devido ao sistema enzimático da GST responsável pela conjugação do CDNB com glutathiona (HUGHES; GALLAGHER, 2004). O rápido consumo de glutathiona leva a crer que nas maiores concentrações, a célula não consegue suprir a necessidade de detoxificação, causando acúmulo de CNDB intracelular, levando ao comprometimento das defesas antioxidantes e favorecendo o aparecimento de danos celulares. O PSH reage de maneira mais lenta que a GSH-t, possivelmente por não possuir um sistema de catálise enzimática. Dessa maneira devido ao curto tempo de exposição dos hemócitos (1 e 4 h), os níveis destes tióis não se alteraram, ao contrário do que aconteceu *in vivo* na brânquia onde a exposição foi por 24 horas.



**Figura 2.** Níveis de tióis de hemócitos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1h ou 4h. (A) Níveis de glutatona total (GSH-t) e (B) níveis de tióis protéicos (PSH). Os resultados são expressos em nmol para cada 1 milhão de células. Os dados foram analisados por ANOVA pareada de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados são expressos como média e erro padrão médio (n = 4-8). Diferenças estatísticas em relação ao respectivo grupo controle são representadas como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Para as análises enzimáticas foi escolhido o tempo de 1h, por causar uma grande perda da viabilidade lisossomal a partir de 12,5  $\mu\text{M}$  de CDNB, sendo as concentrações escolhidas de 2,5 e 50  $\mu\text{M}$ . A primeira foi escolhida por não causar alterações na viabilidade celular, ao mesmo tempo que reduziu os níveis de GSH-t, enquanto que a

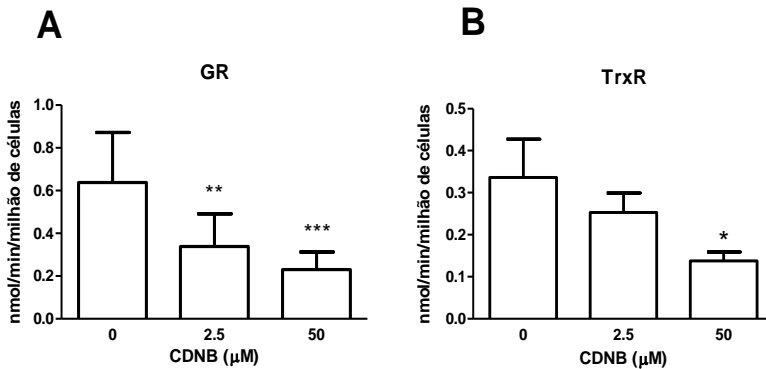


segunda concentração afeta tanto a viabilidade, quanto depleta os níveis de GSH-t.

Foi visto em trabalhos com mamíferos e bivalves que o CDNB inibe as enzimas GR e TrxR (ARNÉR; BJÖRNSTEDT; HOLMGREN, 1995; TREVISAN *et al.*, 2012, 2014). Estas enzimas foram analisadas nos hemócitos para confirmar essa hipótese. Conforme o esperado, a enzima GR (Fig. 3A), responsável pela ciclagem de GSSG para GSH, apresentou menor atividade após o tratamento com CDNB nas duas concentrações testadas (2,5 e 50  $\mu\text{M}$ ). Na concentração de CDNB 2,5  $\mu\text{M}$  foi observada uma diminuição na atividade de 47%, enquanto que na concentração de 50  $\mu\text{M}$  foi de 65% (Fig. 3A). Aparentemente a GR é um importante alvo da toxicidade do CDNB, interferindo na redução de GSSG para GSH (BRADDON; MCILVAINE; BALTHROP, 1985). É importante lembrar que boa parte da GSH-t já está deve estar conjugada irreversivelmente com o CDNB, não havendo GSSG disponível para ser utilizada pela GR, e conseqüentemente, dificultando uma conclusão à respeito dos efeitos biológicos desse composto devido à menor atividade da GR.

No caso da tiorredoxina redutase a atividade foi diminuída em 62% somente na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ). Nesta concentração as células também apresentaram distúrbios na viabilidade lisossomal (Fig. 1), assim como depleção dos níveis de GSH-t (Fig. 2) e menor atividade GR (Fig. 3). Sendo assim, nesta concentração as células apresentam o sistema antioxidante com menor capacidade, podendo comprometer tanto os mecanismos de degradação de peróxido dependentes de glutathione peroxidase (GPx/GR/GSH), como de peroxiredoxinas (Prx/Trx/TrxR). Supondo que os sistemas de degradação de peróxido estejam comprometidos, isto poderia tornar os hemócitos mais susceptíveis ao estresse oxidativo assim como relatado em ostras *C. gigas* e de mexilhões *Perna perna* (TREVISAN *et al.*, 2012, 2014).

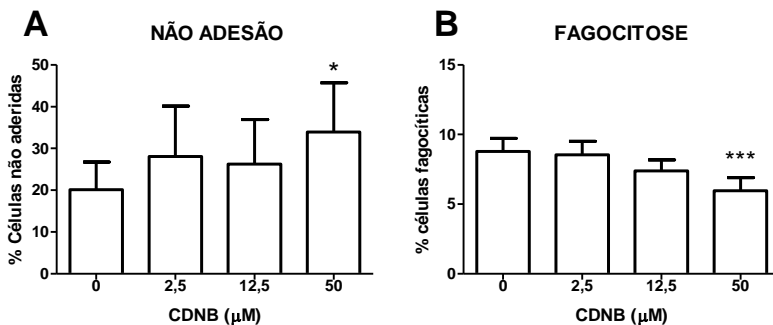
Em células neurais de mamíferos, nas quais a enzima antioxidante GR foi inibida com carmustina, a viabilidade mitocondrial diminuiu, assim como as taxas de detoxificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e também de peróxido de cumeno. Já no caso da enzima TrxR, inibida com auranofina, não foi observado os mesmos resultados, concluindo-se que nas células neurais o sistema de detoxificação GPx/GSH/GR é mais importante que o sistema Prx/Trx/TrxR (MITOZO *et al.*, 2011). No caso dos hemócitos não podemos afirmar qual é o sistema mais influente, pois não foram utilizados inibidores específicos nos ensaios e sim o CDNB, que compromete várias componentes do sistema antioxidante, podendo estar atuando em várias vias.



**Figura 3. Atividade das enzimas antioxidantes de hemócitos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1h.** (A) Glutathione redutase (GR) e (B) tioredoxina redutase (TrxR). Os resultados são expressos como delta da atividade, descontando-se a atividade basal. Os dados foram analisados por uma ANOVA pareada de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados são expressos como média e erro padrão médio (n=6). Diferenças estatísticas dos grupos em relação ao controle são representadas com \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Visto que a viabilidade celular decaiu após o tratamento com CDNB, e o sistema antioxidante apresentou uma menor atividade em hemócitos da ostra *C. gigas*, foi investigado a imunocompetência destas células. Como citado anteriormente a resposta imune é efetuada com a participação dos hemócitos que, através de proteínas em sua membrana celular, promove o reconhecimento do patógeno e posteriormente sua adesão a ele, fagocitose e destruição (TAKAHASHI; MUROGA, 2008).

Ao observar os efeitos do CDNB perante a capacidade de adesão dessas células (Fig. 4A), percebe-se que a maior concentração de CDNB (50 µM) aumenta em aproximadamente 13% a quantidade de células não aderidas. De maneira semelhante, hemócitos de ostras *Crassostrea virginica* expostos a altas pressões de CO<sub>2</sub>, em conjunto com elevados níveis de cádmio, também apresentaram menor capacidade de adesão, possivelmente por alterações no citoesqueleto, metabolismo energético e homeostase de cálcio (IVANINA; HAWKINS; SOKOLOVA, 2014). No presente trabalho, a menor capacidade antioxidante causada pelo CDNB pode afetar a função imunológica dos hemócitos, apesar do mecanismo ainda ser desconhecido.



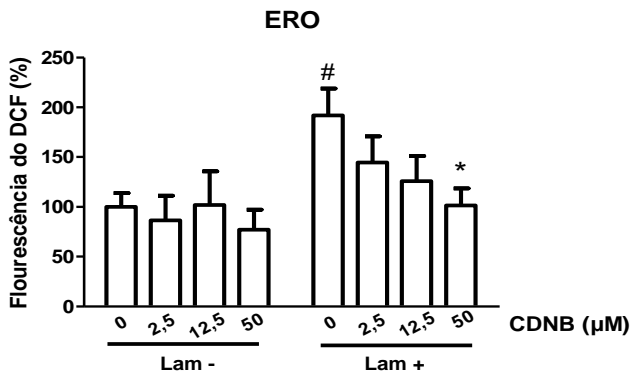
**Figura 4. (A) Taxa de adesão e (B) atividade fagocítica de hemócitos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1h.** Os resultados são expressos em porcentagem em relação à quantidade total de células. Os dados foram analisados por ANOVA pareada de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados são expressos como média e erro padrão médio (A n=6; B n=13). Diferenças estatísticas dos grupos em relação ao controle são representadas com \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Na fagocitose (Fig. 4B), podemos observar o mesmo padrão que na adesão, onde apenas a maior concentração (50 μM) produziu uma diminuição de aproximadamente 32% na taxa de fagocitose. Este resultado corrobora com a ideia de que o CDNB afeta tanto o sistema antioxidante quanto o imunológico, porém esse último de uma maneira mais branda. Em outros estudos com bivalves também foi observada uma diminuição semelhante na taxa de fagocitose dos hemócitos de *Crassostrea virginica*, quando expostos a altas concentrações de metais (CHENG; SULLIVAN, 1984) e em hemócitos de *Mercenaria mercenária* expostos a fenóis (FRIES; TRIPP, 1980). Estes dados mostram que o teste é sensível a outros tipos de contaminantes, e que também podem atuar inibindo ou bloqueando o sistema antioxidante através de diferentes mecanismos moleculares/bioquímicos.

Em vieiras expostas a hidrocarbonetos, as atividades das enzimas antioxidantes catalase, SOD e glutatona peroxidase tiveram aumento de atividade na hemolinfa possivelmente para auxiliar na detoxificação de ERO provenientes da biotransformação desses contaminantes (PAN; REN; LIU, 2006). Porém fica claro que quando os níveis de glutatona diminuem, os hemócitos ficam mais propensos ao estresse oxidativo, tal qual mostra outro trabalho com vieiras expostas a fenantreno, em que os níveis de GSH-t diminuíram nestas células, assim como a fagocitose, causando danos na membrana celular e peroxidação lipídica (HANNAM

*et al.*, 2010). No presente estudo, hemócitos expostos ao CDNB não apresentaram essa correlação de maneira marcante pois o decréscimo nos níveis de GSH-t (Fig. 2A) ocorreu já em concentrações muito baixas de CDNB (0,1  $\mu\text{M}$ ), enquanto que as alterações celulares e imunológicas se apresentaram em concentrações bem mais elevadas (25 - 50  $\mu\text{M}$ ).

Como observado anteriormente, apesar dos distúrbios no sistema antioxidante e dos danos lisossomais, os hemócitos mantiveram parcialmente sua capacidade de realizar adesão e fagocitose. A laminarina foi utilizada para simular um organismo invasor. Ao analisar a produção de ERO nos hemócitos controle, podemos observar um aumento significativo perante a adição de laminarina, a qual induziu a formação de ERO característica do “burst” oxidativo. Após o tratamento com CDNB, na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ), os hemócitos não mais conseguiram ser ativados para produzir ERO (Fig. 5), voltando a uma condição semelhante a dos hemócitos não tratados com laminarina.



**Figura 5. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) de hemócitos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* expostos *in vitro* a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por 1h com ou sem indução pela laminarina (Lam), simulando um organismo invasor.** Os resultados são expressos em porcentagem de fluorescência de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) em relação ao controle (0 $\mu\text{M}$ ). Os dados foram analisados por uma ANOVA pareada de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os resultados são expressos como média e erro padrão médio (n=6). Diferença estatística dos grupos em relação ao seu respectivo controle é representada com \* $p < 0,05$ , enquanto que diferença em relação à indução com laminarina (CDNB 0  $\mu\text{M}$  + Lam) é representada por #  $p < 0,05$ .

A variação na intensidade de fluorescência do DCF, associada com a produção de ERO em hemócitos de moluscos, pode ser muito grande entre indivíduos, porém quando tratados com ativadores e inibidores os efeitos são mais evidentes (BUGGÉ *et al.*, 2007), o que corrobora para a idéia de que os hemócitos de bivalves tentam inativar o possível organismo invasor através da geração de ERO, assim como aconteceu com os hemócitos controle ativados com laminarina (Fig. 5). Este tratamento ativa a NADPH oxidase, que por sua vez, aumenta o consumo de oxigênio ao produzir radical superóxido que é convertido espontaneamente ou enzimaticamente à, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlet. Estas espécies reativas de oxigênio de curta duração podem ser diretamente tóxicos ao patógeno, em conjunto com produtos de peroxidases ou exercer efeitos sinérgicos com enzimas lisossomais (ROCH, 1999).

A enzima NADPH oxidase é associada às membranas celulares externas da célula, dos vacúolos fagocíticos e do lisossomo (DONAGHY *et al.*, 2012). Tendo em vista que a análise de ERO por citometria estima apenas a quantidade intracelular, no caso de hemócitos expostos a CDNB é possível que essa interação esteja prejudicada devido à instabilidade à nível lisossomal, conforme evidenciado pela perda de viabilidade desta organela (Fig. 1B). Em conjunto com a menor taxa de fagocitose, é possível que o fagolisossomo não seja capaz de mediar a proteção contra patógenos necessária pelo organismo. Como o “burst” oxidativo é dependente da NADPH-oxidase, e esta enzima possui sítios tiólicos (SEGAL, 2008), nos quais o CDNB pode estar se ligando, é possível que ocorra uma interação direta entre o CDNB e a enzima, prevenindo sua ativação ou causando sua inibição, o que acaba por gerar a perda da função imunológica dessas células. De qualquer forma, uma menor função imunológica pode tornar esses animais mais suscetíveis a patógenos, comprometendo sua sobrevivência.

De acordo com outro trabalho, os hemócitos quando em seu estado basal produzem ERO principalmente nas mitocôndrias. As ERO mitocondriais atuam na regulação do armazenamento de glicogênio, na função dos canais de íons, detecção de oxigênio, regulação do pH celular, tráfego intracelular e capacidade de adesão (DONAGHY *et al.*, 2012). É possível que em hemócitos não ativados, mesmo com o distúrbio no sistema antioxidante causado pelo CDNB, não estejam ocorrendo grandes alterações celulares, tendo em vista que os níveis de ERO não se alteraram em relação à variação da concentração de CDNB, assim como a viabilidade mitocondrial (após 1 h de exposição). Porém, quando estas células passam a realizar processos de reconhecimento e

ativação, o CDNB atua de maneira mais marcante do que em hemócitos não ativados, uma vez que foi observado maiores alterações em funções celulares. Desta forma, não foi evidenciada uma forte relação entre os distúrbios no sistema antioxidante e a perda de imunocompetência observada nestas células, mas apontam para a o sistema fagossomo/lisossomo como alvo do CDNB em estudos *in vitro*.

Os hemócitos tem ação combinada com os fatores de defesa humorais, tais como aglutininas e peptídeos antimicrobianos, que estão presentes na fração plasmática da hemolinfa desses animais (CANESI *et al.*, 2002b). Como o plasma foi removido, e esses componentes foram retirados, nos estudos *in vitro*, é possível que existam interferências na capacidade dos hemócitos de realizar a adesão, fagocitose e produção de ERO. Porém, existe uma dificuldade de trabalhar *in vitro* utilizando o plasma devido ao aumento na taxa de agregação das células durante as exposições aos compostos de interesse. Entretanto, por ser um primeiro trabalho, é importante ter um sistema de exposição mais simples para melhor compreender os mecanismos de toxicidade.

Visto que a hemolinfa atua como uma interface na transferência de poluentes do ambiente externo para os tecidos celulares, e também dos metabólitos produzidos pelos tecidos, os hemócitos estão susceptíveis aos efeitos deletérios dos xenobiontes (PAN; REN; LIU, 2006). No presente trabalho, ainda não está claro se os hemócitos são sensíveis à diminuição das defesas antioxidantes, ao contrário dos dados obtidos com estudos *in vivo* com as ostras *C. gigas* e mexilhões *P. perna* expostos ao CDNB (TREVISAN *et al.*, 2012, 2014). Podemos inferir, então, que a exposição ao CDNB tem a capacidade de diminuir os níveis de tióis e atividade das enzimas antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro*, afetando de maneira indireta a viabilidade celular e imunocompetência dos hemócitos desses organismos.

## 6. CONCLUSÕES

É conhecido que o comprometimento do sistema imunológico leva a incapacidade de defesa e sobrevivência de bivalves no meio ambiente. O lisossomo, responsável pela neutralização de partículas ou organismos provenientes do meio extracelular, tem um papel fundamental nesse processo. A diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, causada pelo CDNB, mostra que a condição fisiológica dos hemócitos não está íntegra após esta exposição, podendo estar indiretamente relacionada com a perda da viabilidade lisossomal. Entretanto, os distúrbios detectados no sistema antioxidante não foram fortemente relacionados com as disfunções na capacidade imunológica dos hemócitos, tendo em vista que grupos apresentando depleção de glutatona e menor atividade de enzimas antioxidantes mantiveram suas funções imunológicas. Dessa forma, é possível avaliar que as defesas antioxidantes são fundamentais para a homeostase desse tipo celular, que distúrbios nesse sistema podem aumentar a suscetibilidade a estresse oxidativo, porém sem afetar de maneira direta a imunocompetência dos hemócitos.





## 7. PERSPECTIVAS

Afim de ter uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade do CDNB, seria interessante fornecer o plasma novamente, a fim de recolocar os fatores humorais no ensaio. Expor os hemócitos a inibidores específicos das enzimas GR e TrxR ou depletores específicos de GSH, afim de comparar as respostas destes a resposta obtida a exposição com o CDNB que atua de forma mais difusa na célula e também analisar outras enzimas antioxidantes. Para caracterizar se o CDNB pode estar bloqueando o “burst” oxidativo, poderia ser utilizado um inibidor da NADPH oxidase para verificar se com ela totalmente inibida o “burst” oxidativo também seria inibido no grupo controle ativado com laminarina, assim como aconteceu com a exposição ao CDNB. Por último, ensaios bactericidas *in vitro* com hemócitos poderiam fornecer dados interessantes sobre a imunocompetência destas células após exposição ao CDNB, uma vez que este ensaio depende simultaneamente dos mecanismos de adesão, fagocitose e *burst* oxidativo, numa situação semelhante aos processos *in vivo*.



## REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, p. 405–415, 2004.
- ADEMA, C. M. *et al.* Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 15, p. 17–26, 1991.
- ALLEN, J. I.; MOORE, M. N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 227–232, 2004.
- ARNÉR, E. S. J.; BJÖRNSTEDT, M.; HOLMGREN, A. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase: Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 3479–3482, 1995.
- ARNER, E. S. J.; ZHONG, L. W.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Oxidants and Antioxidants, Pt B**, v. 300, p. 226–239, 1999.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, Innate Immunity. v. 40, p. 845–859, 2004.
- BRADDON, S. A.; MCILVAINE, C. M.; BALTHROP, J. E. Distribution of GSH and GSH cycle enzymes in black sea bass (*Centropristis striata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 80, p. 213–216, 1985.
- BRUSCA, R; G. BRUSCA. **Invertebrados**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2003. 968 p.
- BUGGÉ, D. M. *et al.* Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 188–196, 2007.

CANESI, L. *et al.* Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, p. 469–476, 2002a.

CANESI, L. *et al.* Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 547–551, 2002b.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CHENG, T. C.; SULLIVAN, J. T. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. **Marine Environmental Research**, Responses of Marine Organisms to Pollutants. v. 14, p. 305–315, 1984.

CURTIUS, A. J. *et al.* Evaluating trace element contamination in mariculture activities: partial results of a case study carried out in the coastal region of Santa Catarina, Brazil. **Química Nova**, v. 26, p. 44–52, 2003.

DIAH, S. K. *et al.* Detoxification of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in MCF7 breast cancer cells expressing glutathione S-transferase P1-1 and/or multidrug resistance protein 1. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 157, p. 85–93, 1999.

DONAGHY, L. *et al.* Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. **PLoS ONE**, v. 7, p. e46594, 2012.

DOYOTTE, A. *et al.* Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**, v. 39, p. 93–110, 1997.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

EPAGRI. Síntese informativa da maricultura 2013. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina**. (Boletim Técnico). Florianópolis: EPAGRI, 2014. 7 p.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2012. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome: FAO, 2012. 209 p.

FAO. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*. **Text by Helm, M.M.** In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 13 April 2005.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, Proceedings of EUROTOX 2002, The XL European Congress of Toxicology. v. 140–141, p. 353–365, 2003.

FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Cell signalling and the glutathione redox system. **Biochemical Pharmacology**, Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets. v. 64, p. 1057–1064, 2002.

FRANCO, J. L. *et al.* Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 864–872, 2010.

FRIES, C. R.; TRIPP, M. R. Depression of phagocytosis in mercenaria following chemical stress. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 4, p. 233–244, 1980.

GOEDKEN, M.; DE GUISE, S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 539–552, 2004.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

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

HANSEN, B. H. *et al.* Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, p. 263–274, 2006.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 249–265, 2003a.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 237–248, 2003b.

HUGHES, E. M.; GALLAGHER, E. P. Effects of 17- $\beta$  estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 137, p. 237–247, 2004.

IVANINA, A. V.; HAWKINS, C.; SOKOLOVA, I. M. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, p. 299–312, 2014.

JOCELYN, P. Spectrophotometric assay of thiols. **Methods in Enzymology**, v. 143, p. 44–67, 1987.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, p. C849–C868, 2008.

LABREUCHE, Y. *et al.* Cellular and molecular hemocyte responses of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2715–2724, 2006.

LAMBERT, C. *et al.* In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. **Aquaculture**, v. 270, p. 413–421, 2007.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 66, p. 75–87, 2014.

MELLO, D. F. *et al.* Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in vitro* to brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, p. 583–597, 2012.

MITOZO, P. A. *et al.* A study of the relative importance of the peroxiredoxin, catalase, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 69–77, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Release. Brasília: MPA, 2012.

MUROGA, K.; TAKAHASHI, K. G. Review: Overview on the studies of humoral defense factors in bivalve molluscs. **Fish Pathology**, v. 42, p. 1–17, 2007.

NOBLE, D.; LEVIN, J.; SCOTT, W. Biological simulations in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 10–16, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

OLAFSEN, J. A.; FLETCHER, T. C.; GRANT, P. T. Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in*

*vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 16, p. 123–138, 1992.

PAN, L. Q.; REN, J.; LIU, J. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo(a)pyrene and benzo(k)fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari*. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 443–451, 2006.

PEAKALL, D.; BURGER, J. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 110–121, 2003.

PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 16, p. 111–122, 1992.

PIPE, R. K.; COLES, J. A. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 581–595, 1995.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1125–1131, 2008.

RICE, J. Environmental health indicators. **Ocean & Coastal Management**, The Role of Indicators in Integrated Coastal Management. v. 46, p. 235–259, 2003.

ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**, v. 172, p. 125–145, 1999.

SALZET, M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. **Trends in Immunology**, v. 22, p. 285–288, 2001.

SEGAL, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 604–618, 2008.



STAIMER, N. *et al.* Glutathione peroxidase inhibitory assay for electrophilic pollutants in diesel exhaust and tobacco smoke. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 431–441, 2012.

TAKAHASHI, K. G.; MUROGA, K. Cellular defense mechanisms in bivalve molluscs. **Fish Pathology**, v. 43, p. 1–17, 2008.

TATE, S. S.; MEISTER, A. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 39, p. 357–368, 1981.

TERAHARA, K. *et al.* Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster “*Crassostrea gigas*”. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, p. 667–683, 2006.

TERAHARA, K.; TAKAHASHI, K. G.; MORI, K. Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 141, p. 215–222, 2005.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 502–522, 1969.

TOLEDANO, M. B. *et al.* Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1699–1711, 2013.

TREVISAN, R. *et al.* Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 108, p. 85–93, 2012.

TREVISAN, R. *et al.* The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Marine Environmental Research**, v. 101, p. 81–90, 2014.

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

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 137–161, 1991.

XUE, Q.-G. *et al.* Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 11–25, 2004.

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

ZHOU, Q. *et al.* Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 135–150, 2008.