

RÔMI SHARON PIAZZA

RESPOSTAS MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E GENOTÓXICAS
EM VIEIRAS, *Nodipecten nodosus*, EXPOSTAS AO FENANTRENO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis
2016

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

Piazza, Rômi Sharon

Respostas moleculares, bioquímicas e genotóxicas em
vieiras, *Nodipecten nodosus*, expostas ao fenantreno / Rômi
Sharon Piazza ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy -
Florianópolis, SC, 2016.

124 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Transcrição de genes. 3. Sistema
antioxidante. 4. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
(HPAs). 5. Depuração de vieiras *Nodipecten nodosus*. I.
Bainy, Afonso Celso Dias . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
III. Título.

**Respostas moleculares, bioquímicas e genotóxicas em vieiras,
Nodipecten nodosus, expostas ao fenantreno**

Por

RÔMI SHARON PIAZZA

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

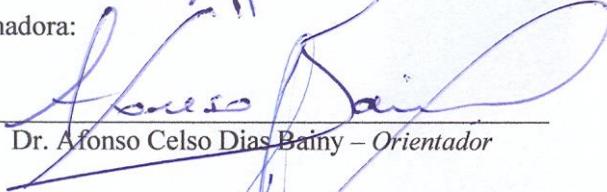
DOUTOR EM AQUICULTURA

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



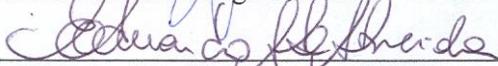
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

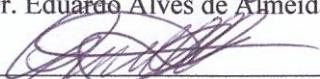


Dr. Afonso Celso Dias Bairy – Orientador

Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo - UFSC



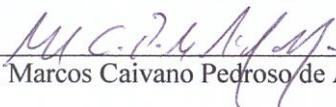
Dr. Eduardo Alves de Almeida - UNESP



Dr. Guilherme de Toledo e Silva - UFSC



Dra. Karim Hahn Luchmann - UDESC



Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque - UFSC

Gostaria de dedicar este trabalho não somente aos meus queridos pais, mas também ao desenvolvimento da Aquicultura e da Ecotoxicologia. Que os dados relatados possam servir de alerta a todos nós, causadores da poluição ambiental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma na conclusão do trabalho, que posso chamar não só de meu, mas de nosso, pois sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Desta forma continuo agradecendo à Deus, por me dar forças para acreditar que tudo é possível quando realmente temos fé, foco e garra.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso C. D. Bairy, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no LABCAI, por ter me direcionado, por ter confiado na minha capacidade, por todo tempo e paciência dispendidos nesses últimos 6 anos de convivência. Essa jornada foi muito importante para meu aprendizado.

Ao CNPq e ao INCT por conceder apoio financeiro e à CAPES e PPGAQI pela bolsa de doutorado.

À Companhia Nacional de Petróleo, Gás e Energia (Petróleo Brasileiro S.A. — Petrobras), por ceder gentilmente uma amostra de petróleo para utilização no experimento.

Agradeço ao meu pai, Nilton, e minha mãe, Naide, que sempre se dedicaram, se esforçaram para me dar uma educação saudável, mostrando que não somente a inteligência é necessária na vida, mas também a sabedoria, humildade, gratidão, compaixão, amor ao próximo, perseverança; assim como outras grandes qualidades, que esses dois amores com seus exemplos de vida, puderam me presentear. Também ao meu irmão, Gio, sempre paciente, carinhoso, um ser humano sensacional. Amo vocês!

Agradeço ao meu marido, Léo, que com carinho e atenção me apoiou com palavras e atitudes nos momentos mais importantes, meu parceiro de sonhos e realidades, de risadas incansáveis, que cuida do meu ♥. Te amo!

Agradeço às minhas Bitchucas, que sem dúvida alguma me fizeram um tantíssimo bem, minhas parceiras de pesquisas, de experimentos, de análises sem fim, de choros, de gargalhadas, de guloseimas, de festinhas... tudo ficou muito melhor com elas. Dai, Flá, Barbarinha, Gabis, Camis, Risis, Lilala, gosto muito, muito mesmo!! Um agradecimento ainda mais especial para a Dai, que sempre me ajudou em tudo, minha parceirinha fiel, obrigada!!

Agradeço ao Rafael Trevisan, por ser essa pessoa tão querida, agradável e inteligente, que se dedicou para que eu pudesse concretizar esse momento tão importante. Muito obrigada!

Agradeço também ao Jacó, Gui T., Miguelito, Álvaro, Fabrício, Nestor, Tatu, Elisa e Clei pela ajuda durante o experimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Claudio Melo por ceder o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) para realização de um dos experimentos.

À Marisa Bercht pelas viagens à fazenda marinha de Porto Belo para a manutenção das vieiras, foram dias muito legais.

Ao Glauber, da Fazenda Marinha da Enseada do Brito e à Fazenda Marinha Paraíso das Ostras pela disponibilização e ajuda no transporte das vieiras.

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

Ao Prof. Dr. Eduardo A. de Almeida por ceder o Laboratório do Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE, UNESP, para as análises de peroxidação lipídica.

Aos professores da Pós-graduação em Aquicultura que contribuíram para minha formação, assim como ao Carlito, que sempre esteve disposto a ajudar e facilitar minha vida estudantil.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em ceder tempo e esforço para contribuir com este estudo e com minha formação.

Às minhas irmãs que eu escolhi e que a vida me presenteou, Fran, Isa, Mila, Nick, Paulinha e Lua por estarmos sempre unidas, fazendo com que até os péssimos momentos se tornassem motivos de risadas. Amo demais!

Agradeço também a todos meus queridos amigos de trabalho, vizinhos de laboratório, companheiros de café e bolo, de risadas e troca de figurinhas, vocês foram muito importantes. Aos funcionários do NEPAQ, por seu companheirismo, momentos de risadas e descontração.

Muitíssimo obrigada!!

“A humanidade parece estar se envolvendo cada vez mais em experiências de destruição de si própria e de seu mundo... não haveria paz em mim, se eu ficasse calada...” R. L. Carson

RESUMO

O crescimento demográfico, assim como a expansão tecnológica e industrial, tem causado sérias ameaças ao ambiente aquático, principalmente nas áreas costeiras. O lançamento de dejetos provenientes das mais variadas ações antrópicas, como os provenientes da indústria do petróleo e esgoto sanitário, provoca danos aos animais aquáticos, colocam em risco a atividade de aquicultura e afeta, conseqüentemente, a população humana. Os dejetos lançados no ambiente, possuem uma das mais variadas e complexas misturas, rica em nutrientes e compostos químicos, podendo formar subprodutos ainda mais tóxicos ao entrarem em contato entre si. Estes compostos químicos podem provocar alterações iniciais a nível fisiológico, celular e molecular nos organismos, e desta forma, estas respostas perante aos contaminantes podem ser utilizadas como biomarcadores de contaminação aquática. Espécies de moluscos bivalves são comumente utilizados como organismos bioindicadores de contaminação aquática. A vieira *Nodipecten nodosus* é uma espécie de importância econômica, principalmente para as regiões Sul e Sudeste do Brasil e possui características importantes como movimentação lenta e capacidade de bioacumular contaminantes em seus tecidos rapidamente. Análises enzimáticas e moleculares são empregadas para elucidação de respostas dos organismos frente à exposição aos contaminantes. O presente estudo teve como objetivo (i) avaliar a capacidade de bioacumulação e depuração das vieiras; (ii) avaliar as respostas de biomarcadores bioquímicos clássicos; (iii) analisar genes conhecidos por atuarem na biotransformação de xenobióticos e potenciais genes candidatos a novos biomarcadores de contaminação aquática em vieiras *N. nodosus*. Para tanto, os exemplares de vieiras foram expostos ao fenantreno e ao óleo cru. Os resultados dos biomarcadores bioquímicos e moleculares foram analisados nas brânquias, 24 e 96 h após a exposição à duas concentrações de fenantreno e 96 h após a depuração; assim, como a análise química dos tecidos, verificou a bioacumulação e eliminação da substância, após 96 h de exposição e depuração. Os resultados indicam que *N. nodosus* é capaz de induzir uma resposta antioxidante relacionada com a biotransformação de fenantreno, e a depuração pode ser um protocolo eficaz para bivalves após a contaminação. Além disso, os resultados referentes à exposição ao óleo cru mostraram um conjunto de 14 genes biomarcadores de contaminação aquática por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), e o uso de brânquias e glândula digestiva como tecidos-alvo. Estes ensaios poderiam ser

aplicados como parâmetros adicionais em programas de biomonitoramento em áreas como as de produção de petróleo ou gás natural, especialmente *offshore*. Isto poderia ajudar a caracterizar a possível contaminação por HPAs em tais áreas, e monitorar a persistência, o destino e os efeitos destas substâncias químicas durante e após os eventos de derramamento de óleo.

Palavras-chave: 1. Aquicultura. 2. Transcrição de genes. 3. Sistema antioxidante. 4. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). 5. Depuração de vieiras *Nodipecten nodosus*

Molecular and biochemical responses in scallops *Nodipecten nodosus*, exposed to phenanthrene and crude oil

ABSTRACT

Population growth, as well as the technological and industrial expansion, has caused serious threats to the aquatic environment, especially in coastal areas. Waste release from human activities, such as oil industry and sewage treatment/discharge, causes damage to aquatic animals, put at risk aquaculture activities and affects the human population. The waste released into the environment is one of the most varied and complex mixtures, rich in nutrients and chemicals, which can form even more toxic by-products when in contact with each other. These chemicals can cause physiological, cellular and molecular changes in the organisms which can be used as biomarkers of water pollution. Bivalve mollusc species are commonly used as bioindicator of water contamination. Scallops *Nodipecten nodosus* is a species of economic importance, especially to the south and southeast Brazil and has important features, such as low mobility and high ability to quickly bioaccumulate contaminants. Enzymatic and molecular analyses are employed to elucidate responses of organisms upon exposure to contaminants. This study aimed to (i) evaluate the bioaccumulation capacity and depuration of scallops; (ii) evaluate the responses of classical biochemical biomarkers; (iii) analyze genes known to work in the biotransformation of xenobiotics and potential candidate genes as new biomarkers of water pollution in scallops *N. nodosus*. Therefore, scallops were exposed to phenanthrene and crude oil. The results of biochemical and molecular biomarkers were analyzed in the gills, after 24 and 96 h of exposure to two phenanthrene concentrations and after 96 h of depuration, as well as chemical analysis of the tissues found to bioaccumulate and removal of the substance after 96 h exposure and depuration. These results indicate that *N. nodosus* is capable of inducing an antioxidant response related to the biotransformation of phenanthrene, and depuration can be an effective protocol for bivalve after contamination. Moreover, the results for exposure to crude oil pointed to a set of 14 genes from *N. nodosus* as biomarkers of aquatic contamination to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and the use of gills and digestive gland as target tissues. These assays could be applied as additional parameters in biomonitoring programs in areas with oil and gas production or contamination, especially offshore ones. This could help to characterize possible PAHs contamination in such

areas, and monitor the persistence, fate and effects of these chemical during and after oil spill events.

Keywords: 1. Aquaculture. 2. Gene transcription 3. Antioxidant system 4. Aromatic Polycyclic Hydrocarbons (PAHs). 5. Depuration of scallops *Nodipecten nodosus*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. (A) Aspecto externo e (B) aspecto interno da vieira *Nodipecten nodosus* – (a) brânquia e (b) glândula digestiva..... 26

CAPÍTULO I

Figura 1. Níveis de fenantreno ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) detectado em tecidos moles de vieiras provenientes do grupo controle (Ct) e expostos (50 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), após 96 h de exposição e depuração (DEP), n= 10 animais por grupo 52

Figura 2. Níveis normalizados da transcrição de genes de biotransformação A – *CYP2D20-like*, B – *CYP2UI-like*, C – *CYP3A11-like*, D – *GST_omega-like*, E – *SULT1B1-like*, F – *SULT4A1-like* em brânquia de vieiras *N. nodosus* expostas ao fenantreno por 24 h, 96 h e depuração por 96 h (DEP). Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – concentração 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (50) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (200) – em relação ao controle (Ct). As letras das colunas não são compartilhadas entre os períodos de exposição (24 h, 96 h or DEP) e são significativamente diferentes ($p < 0,05$), n=10 animais por grupo. *CYP3A29-like*, *CYP3A25-like*, *CYP2J6-like*, *CYP1A5-like*, *CYP1A1-like*, *FABP-like* e *FMO-like* não apresentaram diferenças estatísticas significantes..... 55

Figura 3. Atividade enzimática da A glutaciona peroxidase (GPx), B glutaciona redutase (GR), C catalase (CAT), D superóxido dismutase (SOD), E glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), F glutaciona S-transferase (GST) e G nível de malondialdeído (MDA) em brânquias de vieiras *N. nodosus* expostas ao fenantreno por 24 h, 96 h e depuradas (DEP). Os dados são expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – concentração 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (50) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (200) – em relação ao controle (Ct). As letras das colunas não são compartilhadas entre os períodos de exposição (24 h, 96 h or DEP) e são significativamente diferentes ($p < 0,05$), n=10 animais por grupo 56

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Níveis normalizados da transcrição de genes de biotransformação, A – *CYP2D20-like*, B – *CYP2UI-like*, C – *CYP3A11-like*, D – *MAO-like*, E – *GST_omega-like* e F – *SULT1B1-like* em brânquia de vieiras *N. nodosus* expostas ao óleo cru por 24 h e 96 h. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – E1 (0.33 g L⁻¹) e E2 (0.66 g L⁻¹) – em relação ao controle (Ct). As letras das colunas não são compartilhadas entre os períodos de exposição (24 h e 96 h) e são significativamente diferentes (p<0,05), n=10 animais por grupo.....88

Figura 2 - Níveis normalizados da transcrição de genes de biotransformação A – *CYP2UI-like*, B – *CYP3A11-like*, C – *MAO-like*, D – *GST_omega-like*, E – *SULT1B1-like* e F – *SULT4A1-like* em glândula digestiva de vieiras *N. nodosus* expostas ao óleo cru por 24 e 96 h. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – E1 (0.33 g L⁻¹) e E2 (0.66 g L⁻¹) – em relação ao controle (Ct). As letras das colunas não são compartilhadas entre os períodos de exposição (24 e 96 h) e são significativamente diferentes (p<0,05), n=10 animais por grupo89

Figura 3 - Níveis normalizados da transcrição de genes relativos a diferentes funções celulares: A – *VNN1-like*, B – *YELL-like*, C – *VWA7-like*, D – *FGFR2-like*, E – *PLB1-like*, F – *CREB2-like* e G – *GBS76A-like* em brânquia e H – *GBS76A-like* em glândula digestiva de vieiras *N. nodosus* expostas ao óleo cru por 24h e 96h. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – E1 (0.33 g L⁻¹) e E2 (0.66 g L⁻¹) – em relação ao controle (Ct). As letras das colunas não são compartilhadas entre os períodos de exposição (24 h e 96 h) e são significativamente diferentes (p<0,05), n=10 animais por grupo.....90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para análise de qPCR e amplificação dos genes de referência e genes alvo, com a abreviação e tamanho do amplicon (pb)..... 50

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Sequência dos *iniciadores* utilizados nas análises de qPCR de cada gene alvo e de referência* com a abreviação do gene e função..... 83

Tabela 2 –Níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos tecidos inteiros de vieiras *Nodipecten nodosus* referentes ao controle (Ct) e tratamentos (E1 – 0.33 g L^{-1} e E2 – 0.66 g L^{-1}), após 24 e 96 h de exposição ao óleo cru ($n = 1 \text{ pool}$ de 10 animais)..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Σ : total, soma

~: aproximadamente

μg : micrograma

$\mu\text{g g}^{-1}$: micrograma por grama

$\mu\text{g L}^{-1}$: micrograma por litro

μL : microlitro

$^1\text{O}_2$: oxigênio singlete

CAT: catalase

cDNA: sequência nucleotídica complementar de DNA

CDNB: 2,4-dicloronitrobenzeno

Ct: limiar de detecção em uma reação de qPCR; do inglês *cycle threshold*

CuOOH: hidroperóxido de cumeno

CYP450 (ou CYP): citocromo P450 – número após a sigla representa família

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs (ROS): espécies reativas de oxigênio; do inglês *reactive oxygen species*

EST: etiqueta de sequência expressa; do inglês *expressed sequence tags*

g: força da gravidade

g: grama

G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

GC/MS: técnica acoplada de cromatografia gasosa e espectrometria de massa; do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*

GO: ontologia de genes; do inglês *Gene Ontology*

GPx: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

GST: glutationa S-transferase – letra após a sigla representa isoforma

h: horas

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio

HPAs (PAH): hidrocarboneto policíclico aromático; do inglês *polycyclic aromatic hydrocarbon*

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; do inglês *high-performance liquid chromatography*

KCl: cloreto de potássio

kDa: quilodalton

L: litro

LPO: peroxidação lipídica ou lipoperoxidação; do inglês *lipid peroxidation*

M: molar

m³: metro cúbico

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

MXR: proteína de resistência a múltiplos xenobióticos; do inglês *multixenobiotic resistance*

n: número amostral

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NCBI: Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA; do inglês *National Center for Biotechnology Information*

ng: nanograma

ng g⁻¹: nanograma por grama

NGS: sequenciamento de próxima geração; do inglês *next-generation sequencing*

nm: nanômetro

O₂⁻: ânion superóxido

°C: graus Celsius

p: significância estatística

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase; do inglês *polymerase chain reaction*

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: fenil-metil-sulfunil-fluoreto

p/v: peso/volume

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RNA: ácido ribonucléico

RNase: ribonuclease

RPM: rotações por minuto

rRNA: RNA ribossomal

RT-PCR: PCR via transcrição reversa; do inglês *reverse transcription PCR*

S.D.: desvio padrão; do inglês *standard deviation*

s: segundos

SOD: superóxido dismutase

SULT: sulfotransferase

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloro

US EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; do inglês *United States Environmental Protection Agency*

v/v: volume/volume

w/v: peso/volume; do inglês weight/volume

$2^{-\Delta Ct}$: método comparativo de Ct para quantificação relativa da transcrição do gene de interesse

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	25
Aquicultura: panorama geral	25
Contaminação aquática	26
Ecotoxicologia: ferramentas e finalidade	29
Biomarcadores bioquímicos	31
Biomarcadores moleculares	35
Depuração: sanidade animal e qualidade para o consumo	36
Estrutura e objetivos da Tese	37
CAPÍTULO 1. Exposição ao fenantreno e depuração: Diferenças na transcrição de genes, atividade enzimática e peroxidação lipídica em brânquias de vieiras <i>Nodipecten nodosus</i>	41
Resumo.....	41
Abstract	42
Introdução	43
Materiais e Métodos	46
Análise estatística.....	51
Resultados	51
Discussão.....	53
Referências.....	62
CAPÍTULO 1. Exposição ao óleo cru em bivalves: bioacumulação de HPAs e efeitos na transcrição de genes em vieiras <i>Nodipecten nodosus</i>	75
Resumo.....	75
Abstract	76
Introdução	78
Materiais e Métodos	80
Análise estatística.....	84
Resultados	84
Discussão.....	91
Referências.....	98
CONCLUSÕES FINAIS	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	113

INTRODUÇÃO GERAL



Aquicultura: panorama geral

A aquicultura busca a preservação dos estoques naturais através da produção sustentável de organismos aquáticos cultiváveis. É considerada uma atividade que gera empregos e incentiva o consumo de pescados em diversas regiões (BUIRAGO et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008).

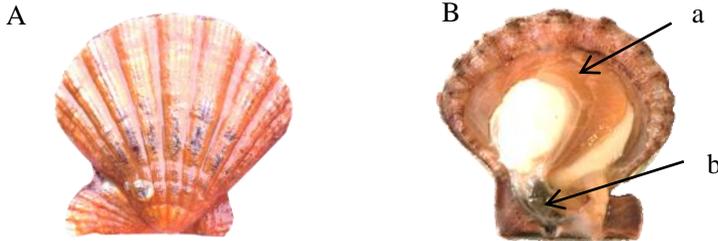
Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial de peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas alcançou 101,1 milhões de toneladas em 2014, o que representa 52% da produção total da pesca. Neste mesmo ano um marco foi alcançado, quando pela primeira vez, a população mundial consumiu mais animais cultivados do que capturados (FAO, 2016).

O Brasil destaca-se como décimo sétimo país no panorama mundial de produção de pescado, com uma produção aquícola de 561.803 toneladas (FAO, 2016, MPA, 2011). O Estado de Santa Catarina é reconhecido por ser o maior produtor brasileiro de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras), atingindo em 2015, uma produção 20.438 toneladas (EPAGRI, 2015).

As vieiras são consideradas organismos de grande interesse para a aquicultura mundial pois apresentam alta taxa de crescimento, população natural escassa e potencial para a comercialização por terem uma boa aceitação do mercado consumidor, o que confere valor agregado ao produto. No Brasil, os moluscos bivalves da família Pectinidae são representados por 5 gêneros e 15 espécies das quais *Nodipecten nodosus* e *Euvola zic zac* são as espécies mais conhecidas comercialmente (RIOS et al., 2009; RUPP & PARSON, 2006).

A espécie de vieira *Nodipecten nodosus* (Figura 1), também conhecida por pata-de-leão, *shell* ou *coquille* apresenta alto valor econômico e sustenta uma importante indústria de cultivo. É considerada uma iguaria, servida nos restaurantes mais refinados, com sabor apreciado e alto valor nutritivo, o que lhe confere um alto valor de mercado (RUPP; PARSONS, 2004). Na costa brasileira, apresenta distribuição descontínua limitada aos Estados do Rio de Janeiro e Sul de Santa Catarina, e habitam naturalmente as águas costeiras das plataformas continentais, em locais que variam de 1 a 30 m de profundidade (RUPP; PARSONS, 2004).

Figura 1. (A) Aspecto externo e (B) aspecto interno da vieira *Nodipecten nodosus* – (a) brânquia e (b) glândula digestiva (Fonte: elaborada pelo autor).



A produção de vieiras *N. nodosus* ocupam o terceiro lugar no ranking da produção total de moluscos no Estado de Santa Catarina (37.2t). A produção ainda é considerada pequena em comparação a de mexilhões (17.370t) e ostras (3.030t), pois a atividade é afetada pela baixa rusticidade do animal, que apresenta maior sensibilidade no período de verão, onde a salinidade da água se torna mais baixa em função das chuvas e a temperatura da água aumenta. Porém, seu valor no mercado é alto e em 2015 proporcionou uma movimentação financeira bruta de R\$1.267.321,20 para o Estado (EPAGRI, 2015).

Contaminação aquática

O ecossistema aquático é considerado o mais susceptível à contaminação pois se caracteriza como o receptor final de vários tipos de contaminantes (BERTOLETTI, 1990). Nesse contexto, a atividade de produção aquícola, que depende fundamentalmente da qualidade da água, se encontra em meio a uma problemática, pois ambientes livres de contaminação são imprescindíveis para a homeostase dos organismos e para a garantia de uma produção e consumo de qualidade.

O cenário mundial apresenta um crescimento populacional acelerado, atingindo a marca de 7 bilhões de pessoas atualmente (UNFPA, 2016). Grande parte da população (40%) vive em áreas litorâneas, a menos de 100Km da costa (LARUELLE et al., 2012) o que provoca um aumento do lançamento de efluentes sanitários nos receptores aquáticos. Além disso, resíduos industriais são responsáveis pelo lançamento de uma vasta gama de contaminantes que afetam drasticamente o meio ambiente (BRAGA et al., 2000; SEKOVSKI, I.; NEWTON, A.; DENNISON, W. C., 2012).

Atualmente, existem milhares de substâncias químicas sendo utilizadas e lançadas nos efluentes e este fato pode causar efeitos danosos aos organismos e ao ecossistema como um todo. O número de substâncias químicas cadastradas na base de dados da CAS REGISTRY é alarmante: mais de 115 milhões de substâncias químicas, com o aporte de mais de 15.000 registros diários de novas substâncias. Dentre as substâncias cadastradas, apenas 345.000 são reguladas por órgãos competentes quanto à sua toxicidade (CAS REGISTRY, 2016).

A constante descarga de contaminantes oriundos das ações antrópicas provoca impactos nas regiões costeiras e litorâneas em todo o globo terrestre. O Brasil foi caracterizado por regiões de médio e altíssimo impacto (como a Região Sudeste) e de fato, por ser um país em desenvolvimento, possui ainda inúmeras deficiências relacionadas às condições básicas de saneamento e tratamento de efluentes (HALPERN, 1998). Segundo o Instituto Trata Brasil e o Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável (CEBDSa, 2014), o país está em 112º lugar de um ranking de 200 países, conforme o avanço no tratamento de água e esgoto. Mais de 100 milhões de brasileiros ainda não possuem coleta de esgoto e somente 38% do esgoto coletado recebe algum tipo de tratamento, nem sempre o adequado (CEBDSb, 2014). O esgoto sanitário é composto por uma mistura de substâncias como fármacos, produtos de higiene, bactérias, pesticidas, derivados de petróleo, entre outros, e considerado um dos principais causadores da poluição ambiental (ABESSA et al., 2005; TEMPLAR et al., 2016).

Além do derramamento contínuo de esgoto sanitário no meio ambiente, as atividades do setor petrolífero (exploração de petróleo e gás natural *offshore*) causam significativa contaminação do ecossistema. Apesar da indústria petrolífera ser considerada fundamental para o desenvolvimento da economia mundial, é responsável por lançar anualmente mais de 1,3 milhões de toneladas de óleo cru (petróleo) no ambiente marinho (LARI, E.; ABTAHI, B.; HASHTROUDI, M. S., 2016), o que a caracteriza como uma atividade que gera grandes impactos ambientais. No Brasil, a produção nacional de petróleo atingiu a marca de 1 milhão de barris/dia em 2016, graças à descoberta do pré-sal, que se trata de campos submarinos de petróleo existentes abaixo de um enorme e espesso lençol de sal, o qual projetou o país a um dos maiores produtores mundiais de petróleo (PETROBRÁS, 2016). Juntamente com este potencial de produção, há um aumento de acidentes que provocam o derramamento de óleo e constantes derrames diários inerentes à exploração do petróleo, através dos fluidos de perfuração, água de descarte, vazamentos nos oleodutos, acidentes em

terra pelo transporte de derivados de petróleo, embarcações, entre outros (PROSPERI; NASCIMENTO, 2006).

O petróleo foi caracterizado como principal fonte poluidora de rios e enseadas em 38% das cidades brasileiras (IBGE, 2005) e estima-se que no ano de 2015 houve o derramamento de mais de 1 milhão de litros de derivados de petróleo no ambiente, pertencentes à classe de risco 3 – Líquidos inflamáveis - sendo o óleo diesel o produto de maior volume vazado, seguido da gasolina e etanol (IBAMA, 2015). Desta forma, o monitoramento de áreas próximas a exploração de petróleo é extremamente necessário, no intuito de prever possíveis contaminações e alertar sobre as possíveis consequências e efeitos deletérios que o petróleo e derivados podem provocar nos animais aquáticos e ecossistema.

O petróleo ou óleo cru é composto basicamente por hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e compostos polares. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são ubiquamente encontrados no ambiente marinho e caracterizados como um grupo de centenas de compostos quimicamente relacionados, ambientalmente persistentes, com várias estruturas e graus de toxicidade (ABDEL-SHAFFY; MANSOUR 2016). A difusão ambiental destes contaminantes tem sido amplamente estudada devido suas características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (BAUMARD et al., 1998) e por estas características, estão incluídos na maioria dos programas de monitoramento ambiental e saúde humana em vários países (WHO, 1983). Embora se tenha conhecimento da presença de centenas de HPAs no meio ambiente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) criou uma lista de substâncias potencialmente tóxicas, conhecida como CERCLA - *Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act* (USEPA, 2014). Esta lista foi baseada na frequência de ocorrência dos contaminantes, na toxicidade e potencial de exposição humana. Nela estão inseridos 16 HPAs considerados prioritários que necessitam de monitoramento constante (USEPA, 2014; AZEVEDO et al., 2008). Dentre os HPAs, destacam-se os que apresentam de dois a cinco anéis, como o naftaleno, fenantreno, criseno, benzo[a]pireno e seus derivados metilados e/ou alquilados (ABDEL-SHAFFY; MANSOUR 2015). Estudos anteriores demonstraram que os HPAs são responsáveis por causar distúrbios significativos em animais aquáticos, como distúrbios fisiológicos, alterações membranares, redução da imunidade, distúrbios moleculares, desequilíbrio da capacidade antioxidante (HANNAM et al., 2010; GRINTZALIS et al., 2012; NOH et al., 2015).

O fenantreno é um HPA amplamente distribuído no ambiente aquático, composto por três anéis aromáticos, semi volátil e apresenta em sua estrutura uma região de baía e uma região K, conhecida por ser altamente reativa, característica de HPAs carcinogênicos, a exemplo do benzo[a]pireno (HANNAM et al., 2010, NING, et al., 2010). O fenantreno, apesar de não ser caracterizado como um composto mutagênico nem carcinogênico, está presente na lista de HPAs prioritários da USEPA, devido a sua abundância e seus efeitos tóxicos no ambiente (USEPA, 2014). Sua característica lipofílica faz com que seja aderido facilmente aos tecidos lipídicos dos organismos aquáticos e vários casos de intoxicação já foram relatados em animais aquáticos (ZACCHI et al., 2017). Alguns estudos demonstram que as concentrações de fenantreno em áreas poluídas podem variar de $14,6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $1460 \mu\text{g L}^{-1}$ em áreas de exploração de petróleo (VRANA et al., 2001; ANYAKORA et al., 2005). Em áreas costeiras urbanizadas de diversas regiões do mundo, as concentrações de fenantreno observadas na água estão entre $0,28 \text{ ng L}^{-1}$ e 78 ng L^{-1} (TELLI-KARAKOÇ et al., 2002; DELGADO et al., 2004; BIHARI; FAFANDEL; PIŠKUR, 2007; WU et al., 2011).

Ecotoxicologia: ferramentas e finalidade

O termo Ecotoxicologia (ramo da toxicologia) foi sugerido pela primeira vez em 1969, por René Truhaut e foi definida como a ciência que estuda as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos pela ação humana, seus mecanismos e efeitos sobre os seres vivos (MAGALHAES & FILHO, 2008). A partir disso, a Ecotoxicologia começou a ser utilizada como ferramenta de biomonitoramento ambiental, baseada principalmente nas respostas dos organismos, perante aos estressores químicos, com o objetivo de impedir e prevenir determinada intoxicação ou saber como interrompê-la, revertê-la e remediá-la por meio de um método pré-definido (MAGALHAES & FILHO, 2008).

Desde a década de 80, as agências ambientais de todo o mundo, principalmente dos EUA e Europa, começaram a desenvolver ferramentas de biomonitoramento, visando o conhecimento, prevenção e mitigação dos impactos causados pelos xenobióticos no meio ambiente. Neste contexto, a USEPA desenvolveu o chamado *Clean Water Act*, um marco regulatório para a implantação de programas de controle da poluição e em 1984 estabeleceu o uso de organismos para fins de monitoramento da qualidade da água (MAGALHÃES & FILHO, 2008).

Em 1986, foi implantado nos EUA, um Programa de Biomonitoramento de compostos ambientais a nível nacional, chamado *Mussel Watch*, que utiliza ostras e mexilhões como organismos bioindicadores para descrever o estado atual e detectar mudanças na qualidade ambiental das águas estuarinas e costeiras por meio de monitoramento ambiental (NCCOS, 2016).

No Brasil, a primeira iniciativa em termos metodológicos se deu no ano de 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas, da *International Organization for Standardization (ISO)* com participação da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Atualmente, contamos com a Resolução do CONAMA n. 357, que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais que prevê a investigação de contaminantes e suas possíveis interações utilizando ensaios ecotoxicológicos (CONAMA, 2005).

Os organismos aquáticos bioindicadores mais utilizados em programas de biomonitoramento são os peixes e moluscos. Os moluscos apresentam amplitude geográfica, são coletados facilmente tanto no ambiente natural quanto em cultivos provenientes da aquicultura, são filtradores, bioacumulam facilmente e rapidamente os compostos tóxicos presentes na água, são sésseis ou apresentam movimentação lenta (como é o caso das vieiras *N. nodosus*) e, portanto, não conseguem escapar facilmente das fontes de contaminação, além de representarem um importante recurso nutricional e econômico (BAINY et al., 2000).

Em ecotoxicologia, o risco apresentado por substâncias químicas potencialmente nocivas é medido em vários níveis de organização. Embora os efeitos sejam mais dramáticos quando vistos a nível de população, estes parâmetros são também os mais difíceis de medir e de relacioná-los a um determinado tóxico (POYNTON et al., 2008). Portanto, os biomarcadores foram desenvolvidos como indicadores fisiológicos de exposição a tóxicos ou efeitos adversos em indivíduos dentro de uma população (HUGGET et al., 1992). Os biomarcadores compreendem desde alterações patológicas (histologia) até alterações moleculares a níveis de expressão de proteínas ou de genes. Em geral, eles são medidos com ensaios rápidos e simples e fornecem provas biológicas de exposição ou efeito (WALKER et al., 2006; POYNTON et al., 2008).

A presença de poluentes no meio ambiente aquático promove uma série de eventos celulares e sistêmicos, conhecidos também como

mecanismos de defesa, no intuito de restaurar a homeostase do animal. A resposta ao estresse inclui três fases diferentes: a fase de alarme, fase de resistência e fase de exaustão. A fase de alarme corresponde a modificações nos parâmetros bioquímicos e genéticos, o que pode resultar em danos ou morte celular. A fase de resistência é caracterizada pela ativação de mecanismos de defesa (defesa antioxidante, reparo de proteínas, biotransformação) que são concomitantes com os primeiros sinais de redução da atividade vital e crescimento, e a fase de exaustão, conhecida pela ocorrência do colapso das funções celulares (integridade da membrana, reprodução), levando a danos crônicos e morte (STEINBERG et al., 2008).

Várias técnicas moleculares e bioquímicas são empregadas para qualificar e quantificar as respostas dos organismos bioindicadores perante aos contaminantes. Estas análises conseguem prever os danos causados pelos contaminantes no ecossistema, pois os efeitos a nível de organização celular/molecular manifestam-se primeiramente, antecipando um efeito deletério irreversível a níveis mais altos de organização biológica, a exemplo de populações e ecossistema (ZAGATTO, 2008; MONSERRAT et al., 2003).

Biomarcadores são definidos como alterações biológicas induzidas pela presença de contaminantes ambientais (xenobióticos) que expressam características moleculares, bioquímicas, celulares, histológicas e fisiológicas (WALKER, et al., 1996; HUGGETT, 1992). Portanto, os biomarcadores podem ser utilizados de forma preventiva, permitindo que ações de biorremediação possam ser realizadas principalmente em áreas impactadas por uma complexa mistura de contaminantes (CAJARAVILLE et al., 2000). Desta forma, a utilização de vários biomarcadores, escolhidos criteriosamente, são necessários para que se obtenha uma resposta ampla da condição de saúde do organismo, garantindo a veracidade dos dados obtidos (FREIRE et al., 2008). Alguns biomarcadores já estão sendo utilizados em programas de biomonitoramento em vários países, por possuírem protocolos bem fundamentados e serem técnicas confiáveis, sensíveis e gerarem resposta em curto prazo de tempo, além de serem relativamente baratas, como análises enzimáticas, análises de transcrição gênica, análises de danos de membrana e DNA, entre outros (FREIRE et al., 2008).

Biomarcadores bioquímicos

Os organismos aquáticos expostos a contaminantes possuem um sistema de composto por enzimas de biotransformação que apresenta

três fases distintas atuantes no mecanismo de detoxificação de xenobióticos (ZHANG et al., 2015). Quando o xenobiótico entra em contato com a célula e é absorvido através da membrana plasmática, o composto pode ser excretado, ou biotransformado primeiramente pela fase I de biotransformação, que envolve reações de oxidação, redução e hidrólise, introduzindo ou expondo grupos funcionais nas moléculas de xenobióticos (-OH, -NH₂, -COOH, etc), que os transformam em compostos hidrofílicos através de reações de detoxificação ou bioativação via citocromo P-450 (CYP450) e flavina monooxigenase (FMO) (MEYER, 1996; OMIECINSKI et al., 2011). Esta primeira fase gera um metabólito primário, que pode ser excretado ou então continuar em um processo de biotransformação de fase II. A fase II é caracterizada pela conjugação dos subprodutos da fase I via glutathione-S-transferase (GSTs) e sulfotransferases (SULTs), resultando em um metabólito secundário, mais hidrossolúvel e fácil de ser excretado, o que evita a reabsorção pelo organismo (TREVISAN, 2014). Na fase III há o envolvimento de proteínas de membrana, identificadas pelos componentes do sistema de resistência a múltiplos xenobióticos (*multixenobiotic resistance* – MXR), que expulsam os xenobióticos da célula (LUCKENBACH; EPEL, 2008; ZHANG et al., 2015). As reações de fase I e II podem provocar algumas alterações nos compostos químicos, potencializando sua toxicidade, pela formação de metabólitos mais reativos. Estes, podem se ligar covalentemente a moléculas de DNA, RNA ou proteínas, que possam interferir no funcionamento normal da célula, aumentando o risco de distúrbios nos animais, como câncer, entre outros (GUENGERICH, 2008; NEBERT; KARP, 2008).

As enzimas CYP, GST e SULTs são muito utilizadas como biomarcadores de contaminação aquática por HPAs em bivalves (GLATT et al., 2001; BEBIANNO; BARREIRA, 2009; MIAO et al., 2011). Componentes do sistema CYP pertencem a uma superfamília presente nos genomas de todos os filos e estão sendo cada vez mais estudadas com o intuito de reconhecer um número crescente de diferentes isoformas de CYP (HANNEMANN et al., 2007; GIULIANI, et al., 2013; MARTINS et al., 2013). Os membros da família CYP são importantes no metabolismo de uma grande variedade de xenobióticos, tais como drogas, substâncias cancerígenas, aditivos alimentares, poluentes, pesticidas ou produtos químicos ambientais (WAXMAN; AZAROFF, 1992; SARKAR et al., 2006). Os CYPs são agrupados de acordo com as classes de substratos que metabolizam e sequência de seus aminoácidos. Os HPAs estão entre os substratos de CYPs da família 1, em mamíferos e em peixes (NEBERT; RUSSEL, 2002).

Outros CYPs pertencentes às famílias CYP2 e CYP3 estão relacionados não apenas à biotransformação de contaminantes, mas também relacionados com o metabolismo de compostos endógenos (TIAN et al., 2014).

As GSTs são classificadas conforme a sequência N-terminal de aminoácidos, especificidade pelo substrato e sensibilidade aos inibidores, e são nomeadas como *alpha*, *beta*, *delta*, *mu*, *omega*, *pi*, *sigma*, *tau*, *theta* e *zeta* (BLANCHETTE et al., 2007; RHEE et al., 2007). Tanto as GSTs, quanto as SULTs desempenham um papel bastante importante no metabolismo dos HPAs e são frequentemente estudadas em mamíferos, porém, em relação a atividade enzimática e transcrição de genes em bivalves, mais estudos são necessários. Além destes genes de biotransformação de xenobióticos, outros genes de diferentes vias metabólicas estão sendo estudados em organismos aquáticos, como genes do sistema imunológico, da via de sinalização, metabolismo de lipídios, processos glicolíticos, metabolismo energético, entre outros (BOUTET et al., 2005; TANGUY et al., 2005; DONDERO et al., 2006). Porém, ainda existem poucos trabalhos referenciando estes genes em organismos bivalves. Desta forma, existem ainda inúmeros genes e isoformas que precisam ser investigados a fim de definir precisamente suas funções catalíticas ou sua importância fisiológica e toxicológica nos organismos.

Outro sistema de defesa presente nos organismos é conhecido como sistema de defesa antioxidante, que combate as espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes do próprio metabolismo celular. O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), assim como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros compostos não radiculares, compõem as EROs. A toxicidade das EROs está relacionada com a capacidade de ocasionar lesões na membrana celular, danos em proteínas e alterações no DNA (ALMEIDA et al., 2007). A produção de EROS ocorre naturalmente nos organismos durante o processo de fosforilação oxidativa para obtenção de energia, ação fagocitária de células de defesa e reações enzimáticas (STOREY, 1996; LUCHMANN, 2012). Através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o oxigênio é reduzido à água, enquanto a adenosina trifosfato (ATP) é gerada como o principal combustível celular. Durante o metabolismo aeróbico, a taxa de consumo de oxigênio pode ser elevada, o que aumenta a probabilidade da produção de derivados tóxicos de oxigênio durante o processo. Desta forma, ao mesmo tempo que o oxigênio é fundamental para a célula em organismos aeróbios, seu metabolismo pode ser um risco para estrutura,

funcionamento e homeostase celular (INOUE et al., 2003; MCCORD, 2000). Além do mais, a produção destas espécies tóxicas pode ser aumentada quando o organismo entra em contato com xenobióticos como os HPAs, como consequência da biotransformação dos compostos orgânicos, e ainda pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas (REGOLI et al., 2002; WALKER et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011).

O estresse oxidativo é definido como o desbalanço entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes e pode promover processos biológicos a nível celular, sistêmico e populacional. Em animais aquáticos podem estar relacionados a taxas reduzidas de crescimento, reprodução e sobrevivência, assim como ao desenvolvimento de anomalias através de mutações gênicas e processos carcinogênicos (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992; REGOLI et al., 2002; PATETSINI et al., 2013). Também pode provocar a peroxidação lipídica, de proteínas e ácidos nucleicos (ZHANG, et al., 2015). Para combater o estresse oxidativo e manter a homeostase animal, o sistema de defesa antioxidante é composto por enzimas que facilitam a excreção das EROs, como a superóxido dismutase (SOD), que é uma metaloenzima encontrada principalmente no citosol, que atua sobre o radical O_2^- , transformando-o em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode ser decomposto por diferentes enzimas. Uma delas é a catalase (CAT), uma hemoproteína encontrada principalmente nos peroxissomos, mas também no citosol, que transforma o H_2O_2 em uma molécula de oxigênio molecular (O_2) e duas moléculas de H_2O . A GPx, uma selenoproteína presente no citosol, mitocôndria e meio extracelular, também é responsável por transformar o H_2O_2 através do intermediário da glutationa (GSH) (TREVISAN, 2014). Além das enzimas antioxidantes, o sistema de defesa conta com a atividade de enzimas auxiliares como a glutationa redutase (GR) que reduz a glutationa oxidada (GSSG) a GSH, e a glicose-6-fosfato desidrogenase, que através da nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) converte a GSSG em GSH (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Além dos danos ao DNA, as EROS podem afetar a membrana lipídica. O processo de peroxidação lipídica ocorre a partir de uma cadeia de reações resultantes da ação dos radicais livres sobre os ácidos graxos insaturados das membranas celulares, que degrada sua estrutura e pode levar à perda das funções celulares (BENZIE, 1996). Uma das técnicas mais utilizadas para verificar a peroxidação lipídica é através da quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA), o qual é um produto

secundário formado durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (LIMA, ABDALLA, 2001).

Biomarcadores moleculares

Geralmente, os primeiros sinais ou respostas biológicas dos animais contaminados por substâncias químicas são verificados através dos níveis de transcrição gênica (BRULLE et al., 2008). Os xenobióticos se ligam aos receptores celulares que vão interagir com sequências específicas de DNA, promovendo a transcrição de genes que podem ser traduzidos a proteínas/enzimas (PIÑA; CASADO; QUIRÓS, 2007; FLORES-NUNES, 2013). Os genes transcritos podem apresentar alterações em função da exposição do organismo aos contaminantes, como o aumento ou redução dos seus níveis de transcritos. Neste contexto, os biomarcadores moleculares são aplicados amplamente em estudos ecotoxicológicos, e fazem parte de um campo da ciência conhecido como ecotoxicogenômica (CHAPMAN et al., 2011).

A ecotoxicogenômica integra a genômica, incluindo a transcriptômica, proteômica e metabolômica à estudos ecotoxicológicos, e oferecem maior sensibilidade e especificidade quando comparada à biomarcadores bioquímicos clássicos, pois as respostas destes podem ser inespecíficas em relação ao contaminante avaliado (SNAPE et al., 2004; POYNTON et al., 2008). Como as análises genômicas caracterizam as respostas moleculares do organismo perante aos contaminantes, fornecem uma visão mais abrangente dos efeitos tóxicos causados e dos mecanismos compensatórios utilizados pelo organismo em sua defesa (POYNTON et al., 2008). Dentro do contexto da ecotoxicogenômica, a transcriptômica identifica genes de organismos no qual o genoma não é conhecido ou é pouco caracterizado, através do sequenciamento de DNA complementar (cDNA). Desta forma, é possível identificar inúmeras sequências produzidas por um organismo em uma determinada condição ambiental (LUCHMANN, 2012). Uma vez que os genes são identificados, a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) deve ser utilizada para validar a transcrição diferencial de genes e assim caracterizados como biomarcadores biológicos de resposta (JAYAPAL et al., 2010). A técnica de qPCR apesar de ser relativamente cara, ainda é bastante utilizada para validar e quantificar as possíveis diferenciações ocasionadas por doenças ou contaminantes ambientais nos organismos (MARDIS, 2008). Desta forma, os genes biomarcadores podem ter tanto um aumento no seu número de

transcritos, como uma redução dos seus níveis, dependendo das condições ambientais.

Depuração: sanidade animal e qualidade para o consumo

Do ponto de vista microbiológico, a depuração é definida como um processo aplicado aos moluscos bivalves, com a finalidade de reduzir sua contaminação microbiana a níveis aceitáveis para o consumo humano, podendo ocorrer no ambiente natural ou em dependências de processamento situadas em estabelecimentos industriais (EPAGRI, 2014). Pelo fato dos moluscos serem bons filtradores e terem a capacidade de bioacumular microrganismos e substâncias químicas em seus tecidos, vários países já exigem a utilização de protocolos de depuração a fim de minimizar e remover bactérias, contaminantes virais, metais traços, organoclorados, pesticidas, PCBs e dioxinas (FAO, 2008; MAM, 2014). No Brasil, até o ano de 2012, não existia legislação específica para o controle higiênico-sanitário de moluscos bivalves, porém, por meio de um convênio entre o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), o Estado de Santa Catarina passou a estruturar seu programa de controle higiênico-sanitário de moluscos bivalves com bases oficiais. As diretrizes visam o monitoramento de microrganismos contaminantes e biotoxinas marinhas (EPAGRI, 2014), portanto não é realizado o controle de metais e substâncias químicas orgânicas.

A Resolução n.º 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), define a concentração de alguns HPAs e metais em águas doce, salobras e salinas e observa-se que nos locais onde existem cultivos de organismos voltados ao consumo humano, os teores máximos de HPAs individuais são bastante restritivos ($0,018 \mu\text{g L}^{-1}$) na água. Na União Europeia, a legislação vigente - Regulamento (UE) n.º 835/2011 - limita o uso de diversas substâncias químicas, como fármacos, HPAs, metais, nitratos, entre outros. Em relação aos HPAs, a legislação estabelece limites máximos para 4 HPAs considerados potenciais carcinogênicos: benzo(a)pireno, benz(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno (USEPA, 2009), sendo que as concentrações de benzo(a)pireno não podem ultrapassar $6 \mu\text{g/kg}$ de peso fresco e a soma dos quatro, não ultrapassar $35 \mu\text{g/kg}$ de peso fresco.

Como citado anteriormente, a depuração pode ser realizada tanto em ambientes naturais, pela realocação dos animais para zonas mais

limpas, quanto em ambientes controlados. Nestes ambientes, a depuração pode ser realizada através de sistema estático, de recirculação, ou contínuo, juntamente com a utilização de ozônio, cloro e/ou filtro UV (EPAGRI, 2014). Vários estudos experimentais comprovaram a eficiência da depuração UV na redução de microrganismos que ameaçam a saúde pública (SÜß et al., 2009; LEAL DIEGO et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Resultados relacionados à bioacumulação e depuração de HPAs em moluscos não apresentam um padrão definido, especialmente porque as respostas dos animais podem variar devido ao sexo, fase reprodutiva, efeitos sazonais, variabilidade genética, interação entre diferentes xenobióticos, tempo e tipo de depuração (SERICANO et al., 1996; XIU et al., 2015). A depuração UV foi relacionada à ativação de metabólitos de HPAs e ao aumento na produção de EROS, desencadeando alterações biológicas nos animais (SÜß et al., 2009; LEAL DIEGO et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Contudo, não existem resultados demonstrando a eficiência desses tratamentos em condições não experimentais em escala industrial, no Estado de SC, o que dificulta e praticamente inviabiliza a utilização da depuração como forma de prevenção e garantia de um produto final de qualidade.

Porém, do ponto de vista ambiental, a depuração apresenta resultados positivos, já que os animais contaminados possuem a capacidade de eliminar as substâncias indesejáveis de seus organismos quando transportados para locais de água mais limpa e com boa circulação. Com os dados gerados neste estudo, espera-se também enfatizar o uso da depuração como forma de combate e/ou redução de contaminantes (presente nos tecidos animais) até então não controlados pela legislação brasileira; promover a saúde dos animais, onde a depuração entraria como forma mitigadora dos efeitos causados pela exposição dos animais a substâncias químicas; e também a promoção da saúde da população.

Estrutura e objetivos da tese

A ecotoxicologia é uma ciência oriunda da toxicologia que utiliza de ferramentas extremamente importantes para o monitoramento ambiental. Com base no contexto apresentado, de fato, é uma área em expansão que requer constantes estudos que vislumbrem o preenchimento das necessidades e lacunas ainda existentes. Assim, este estudo representa mais um passo na busca de respostas relacionadas ao

uso de organismos aquáticos bioindicadores de contaminação por HPAs e biomarcadores e tem como Objetivo Geral:

- Analisar biomarcadores moleculares e bioquímicos em vieiras *Nodipecten nodosus* expostas à hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, com o intuito de verificar as respostas referentes à transcrição de genes de biotransformação e atividade de enzimas participantes do sistema antioxidante, assim como respostas referente a genes com funções associadas a imunidade, metabolismo energético e reparo celular e estabelecer biomarcadores sensíveis para a avaliação do ambiente aquático.

Neste sentido, as vieiras foram expostas a duas concentrações de fenantreno e, posteriormente submetidas a um período de depuração; em outro experimento, foram expostas a duas concentrações de óleo cru. Os dados gerados nesta Tese podem se tornar importantes fontes de informação para pesquisas relacionadas com a contaminação das águas por substâncias derivadas do petróleo e contribuir para um programa de biomonitoramento ambiental de águas costeiras.

Os Capítulos 1 e 2 apresentam artigos a serem publicaos em periódicos científicos.

O Capítulo 1 se refere ao experimento realizado com vieiras *N. nodosus* expostas por 24 e 96 h a duas concentrações de fenantreno, seguido de 96 h de depuração. Este estudo foi publicado na revista *Aquatic Toxicology* (PIAZZA et al., 2016) e tem como Objetivos específicos:

- Investigar a atividade do sistema antioxidante e biotransformação por meio da atividade das enzimas SOD, CAT, GR, GPx, G6PDH e GST e níveis de peroxidação lipídica;
- Verificar os níveis de transcrição de genes relacionados à biotransformação de xenobióticos e metabolização de lipídios, como: *CYP1A1-like*, *CYP1A5-like*, *CYP2D20-like*, *CYP2J6-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, *CYP3A25-like*, *CYP3A29-like*, *FABP-like*, *GST_omega-like*, *SULT1B1-like*, *SULT1C1-like*, *SULT4A1-like* e *FMO-like*;

- Verificar os níveis de bioacumulação e capacidade de depuração nos tecidos inteiros das vieiras;
- Verificar o potencial da depuração natural em sistema estático na redução de fenantreno dos tecidos das vieiras.

O Capítulo 2 está em fase final da redação do manuscrito, o qual será submetido para a Revista Aquatic Toxicology e tem como Objetivos específicos:

- Analisar genes previamente identificados através do transcriptoma de *N. nodosus* (manuscrito em preparação), em animais expostos ao petróleo.

Os genes foram analisados em brânquias e glândula digestiva das vieiras, após 24 e 96 h de exposição à duas concentrações de óleo cru, pelo método de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e estão associados às vias de biotransformação, função imune, reparo celular, crescimento e metabolismo energético: *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, *MAO-like*, *GST_omega-like*, *SULT1B1-like*, *SULT4A1-like*, *VWA7-like*, *VNN1-like*, *YELL-like*, *TRIM56-like*, *STAT2-like*, *FGFR2-like*, *PLB1-like*, *CREB2-like*, *MYG-like*, *ACHA2-like*, *NTD-like*, *ZRAB3-like*, *P4HA3-like*, *GBS76A-like*.

CAPÍTULO 1

Exposição ao fenantreno e depuração: Diferenças na transcrição de genes, atividade enzimática e peroxidação lipídica em brânquias de vieiras *Nodipecten nodosus*

Rômi S. Piazza^a, Rafael Trevisan^a, Fabrício Flores-Nunes^a, Guilherme Toledo-Silva^a, Nestor Wendt^a, Jacó J. Mattos^b, Daína Lima^a, Satie Taniguchi^c, Silvio Tarou Sasaki^c, Álvaro C.P. Mello^a, Flávia L. Zacchi^a, Miguel A. S. Serrano^a, Carlos H. A. M. Gomes^d, Márcia C. Bicego^c, Eduardo A. de Almeida^e, Afonso C.D. Bainy^a

^aLaboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil; ^bNúcleo de Pesquisas em Patologia Aquícola – NEPAQ, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil; ^cLaboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ^dLaboratório de Moluscos Marinhos – LMM – Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil; ^e Departamento de Química Ciências Ambientais, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Artigo publicado na Revista Aquatic Toxicology volume 177, páginas 146-155, 2016.

Resumo

Compreender o mecanismo de biotransformação do fenantreno (PHE) e relacioná-lo às respostas celulares em bivalves pode constituir uma ferramenta importante para elucidar os riscos que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam aos organismos aquáticos. No presente estudo foram analisados níveis de transcrição de 13 genes de biotransformação relacionados ao citocromo P450 (CYP), glutatona S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT), flavina monooxigenase e proteínas de ligação de ácidos graxos através de qPCR em brânquia de vieiras *Nodipecten nodosus* expostas ao fenantreno por 24 e 96 h às concentrações de 50 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (equivalente a 0,28 e 1,12 μM , respectivamente), seguida por uma depuração em água limpa durante 96 h (DEP). A atividade enzimática da catalase (CAT), glutatona

peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutationa S-transferase (GST) e níveis de peroxidação lipídica (MDA) também foram quantificados. Foi verificado um aumento nos níveis transcricionais dos genes *CYP2UI-like*, *CYP2D20-like*, *CYP3A11-like*, *GST_omega-like*, *SULT1B1-like* após 24 e 96 h de exposição dos organismos ao fenantreno. Em paralelo, a atividade das enzimas GR e GPX aumentou após 96 h de exposição à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e da G6PDH aumentou após 24 h de exposição à 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este aumento verificado no sistema antioxidante e nas fases I e II de biotransformação podem estar relacionados com o aumento da bioacumulação de fenantreno nos tecidos das vieiras (2,7 e 12,5 vezes) após 96 h de exposição a ambas concentrações, respectivamente. Curiosamente, DEP causou um restabelecimento da atividade da GPX e GR, bem como dos níveis de transcrição de todos os genes de biotransformação que apresentaram aumento significativo após a exposição ao fenantreno (exceto *SULT1B1-like*). Os níveis de bioacumulação de fenantreno diminuiram 2,5-2,9 vezes após a depuração, embora algumas alterações bioquímicas e moleculares ainda tenham permanecido. Os níveis de MDA permaneceram menores nos animais expostos à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 24 h e após DEP. Estes dados demonstraram que *N. nodosus* foram capazes de induzir uma resposta antioxidante e de biotransformação após exposição ao fenantreno, contrariando a sua toxicidade, e o sistema de depuração utilizados pode ser um protocolo eficaz para a depuração de bivalves após exposição ao fenantreno.

Palavras-chave: fenantreno, biotransformação, vieiras, *Nodipecten nodosus*, depuração, moluscos.

Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*

Abstract

Understanding the mechanism of phenanthrene (PHE) biotransformation and related cellular responses in bivalves can be an important tool to

elucidate the risks of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to aquatic organisms. In the present study, it was analyzed the transcriptional levels of 13 biotransformation genes related to cytochrome P450 (CYP), glutathione S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT), flavin-containing monooxygenase and fatty acid-binding proteins by qPCR in gill of scallops *Nodipecten nodosus* exposed for 24 or 96 h to 50 or 200 μgL^{-1} PHE (equivalent to 0.28 and 1.12 μM , respectively), followed by depuration in clean water for 96 h (DEP). Likewise, it was quantified the activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), GST and levels of lipid peroxidation. Increased transcriptional levels of *CYP2U1-like*, *CYP2D20-like*, *CYP3A11-like*, *GST_omega-like*, *SULT1B1-like* genes were detected in organisms exposed to PHE for 24 or 96 h. In parallel, GR and GPX activities increased after 96 h exposure to 200 μgL^{-1} PHE and G6PDH activity increased after 24 h exposure to 50 μgL^{-1} PHE. This enhancement of antioxidant and phase I and II biotransformation systems may be related to the 2.7 and 12.5 fold increases in PHE bioaccumulation after 96 h exposure to 50 and 200 μgL^{-1} PHE, respectively. Interestingly, DEP caused reestablishment of GPX and GR activity, as well as to the transcript levels of all upregulated biotransformation genes (except for *SULT1B1-like*). Bioaccumulated PHE levels decreased 2.5–2.9 fold after depuration, although some biochemical and molecular modifications were still present. Lipid peroxidation levels remained lower in animals exposed to 200 μgL^{-1} PHE for 24 h and DEP. These data indicate that *N. nodosus* is able to induce an antioxidant and biotransformation-related response to PHE exposure, counteracting its toxicity, and DEP can be an effective protocol for bivalve depuration after PHE exposure.

Keywords: phenanthrene, biotransformation, scallops, *Nodipecten nodosus*, depuration, mollusks.

Introdução

O meio ambiente aquático é considerado bastante vulnerável à pressão antrópica por ser o destinatário final de uma variedade de poluentes. Os derramamentos de petróleo estão entre os principais fatores causadores da contaminação marinha, visto que cerca de 87

milhões de barris de petróleo são produzidos globalmente todos os dias. O óleo derramado é composto principalmente por hidrocarbonetos alifáticos/hidrocarbonetos aromáticos e compostos polares e, perdas/derrames podem ocorrer durante o processo de transporte e processos pirolíticos, além das descargas de águas residuais, domésticas e industriais (Martins et al., 2013; Wei et al., 2015). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os principais componentes de petróleo bruto, são ubiquamente encontrados no ambiente marinho. Entre eles encontra-se o fenantreno (PHE), um HPA de baixo peso molecular com três anéis benzênicos e é um componente representativo em ecossistemas marinhos contaminados (De Luca-Abbott et al., 2005; Schäfer and Köhler, 2009).

O PHE é frequentemente utilizado como modelo no estudo do metabolismo de HPAs por sua biodisponibilidade no ambiente marinho (Hannam et al., 2010a; Wootton et al., 2003). É o menor HPAs a apresentar uma região de baía e uma região K, que são regiões altamente reativas, onde as principais espécies cancerígenas podem ser formadas (Zhang et al., 2014). Devido à sua alta natureza lipofílica, o fenantreno pode facilmente penetrar nas membranas biológicas; sua bioacumulação tende a ser bastante rápida e, por ser um poluente orgânico persistente, pode indicar riscos à saúde até mesmo depois de várias décadas de exposição (Jin et al., 2015; Noh et al., 2015; Xiu et al., 2015). Além disso, o fenantreno foi incluído na lista "Poluentes Prioritários" pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), e, embora não seja considerado carcinogênico nem mutagênico, pode ser tóxico para vários animais marinhos (Zhang et al., 2014).

Estudos demonstram que fenantreno induz o estresse oxidativo, imunossupressão e genotoxicidade em moluscos, além de alterações moleculares em nível de transcrição de genes (Einsporn and Koehler, 2008; Hannam et al., 2010a). A toxicidade dos HPAs está associada aos mecanismos de desintoxicação celular pois, alguns dos metabólitos produzidos durante a biotransformação são altamente reativos podendo formar adutos de DNA (Akcha et al., 2000). Diferentes mecanismos de toxicidade do fenantreno têm sido propostos, mas a evidência mais convincente está relacionada à sua ativação metabólica por membros da superfamília do citocromo P450 (CYP) durante a fase I de biotransformação (Schlenk, 1998; Zanette et al., 2008). Os subprodutos da fase I de biotransformação podem ser conjugados a substratos endógenos durante a fase II, sendo catalisada por enzimas como a glutatona-S-transferase (GST) e sulfotransferases (SULTs), formando compostos hidrofílicos para posterior excreção.

A biotransformação de HPAs pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), oxidando proteínas, DNA e aumentando a peroxidação lipídica (Grintzalis et al., 2012; Noh et al., 2015). Conseqüentemente, um complexo conjunto de sistemas antioxidantes atua na prevenção de dano oxidativo cumulativo, neutralizando o excesso de EROs (Halliwell and Gutteridge, 1985). Além disso, animais submetidos ao estresse têm um aumento na demanda de energia, mobilizando combustível metabólico (ácidos graxos) para a sobrevivência. Proteínas de ligação de ácidos graxos (FABP) são altamente ativas no metabolismo de ácidos graxos, participam da absorção, transporte e homeostase de lipídeos (Bayır et al., 2015; Travers et al., 2010).

O uso de bivalves em estudos relacionados com a contaminação aquática tem aumentado ao longo da última década, especialmente em relação à HPAs, petróleo bruto, pesticidas e toxicidade de metais (Hannam et al., 2010a). A vieira *N. nodosus* é considerada um organismo sentinela, possui ampla distribuição geográfica (dos EUA até o Brasil) e é susceptível a um grande número de contaminantes, além do seu importante valor econômico (Cranford, 2006; Freitas et al., 2010). Considerando seu comportamento filtrador e sua capacidade de bioacumulação de xenobióticos, a legislação em alguns países solicita a utilização de protocolos de depuração, a fim de minimizar os riscos de contaminação humana. Neste contexto, é evidente que os procedimentos de depuração podem ajudar a melhorar a saúde dos bivalves e da produção em geral. A depuração pode ser uma ferramenta eficaz na remoção de muitas bactérias termotolerantes, contaminantes virais, vibrios, biotoxinas, metais traço ou produtos químicos orgânicos (FAO, 2008).

Englobando estes questionamentos e, a fim de obter respostas para esclarecer os mecanismos de biotransformação do fenantreno, o objetivo deste estudo foi investigar as mudanças nas atividades de biotransformação e enzimas antioxidantes, níveis de peroxidação lipídica, bem como os níveis de transcrição de genes importantes nos mecanismos de biotransformação de HPAs em brânquias de *N. nodosus*. Um protocolo de depuração foi desenvolvido e testado de forma a estimar a aplicabilidade desta técnica para permitir a descontaminação de animais expostos à HPAs.

Materiais e Métodos

Vieiras e condições de exposição

Vieiras *N. nodosus* de comprimento de concha semelhante (6,0-8,0 cm) foram coletadas de um cultivo na praia da Enseada do Brito, (SC-Brasil). Após a coleta, os animais foram limpos e transportados para o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM, UFSC, Brasil) e passaram por um período de aclimação de 7 dias antes da exposição. Os animais foram colocados em tanques de fibra de vidro, com aeração constante e água do mar filtrada (0,45 μ m). Na parte inferior do tanque foi colocada uma rede para evitar que os animais entrassem em contato com o fundo do tanque. Um sistema de renovação de água (1,4 L min⁻¹, 30 salinidade e 18°C) foi aplicado, e as vieiras foram alimentadas com uma dieta de manutenção (uma mistura de algas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri*).

Fenantreno (P1140-9, 98 % de pureza, *Sigma - Aldrich*) foi dissolvido em dimetil-sulfóxido (DMSO) e água do mar filtrada foi adicionada para que as concentrações nominais finais de fenantreno fossem de 50 e 200 μ g L⁻¹, equivalente a 0,28 e 1,12 μ M, com concentração máxima final de DMSO de 0,01 % (v/v). As concentrações de fenantreno foram escolhidas baseadas em estudos anteriores com bivalves (Hannam et al., 2010a, 2010b; Wootton et al., 2003; Zhang et al., 2014). As vieiras foram alocadas em três tanques estáticos com as mesmas condições após o período de aclimação (grupo controle, 50 e 200 μ g L⁻¹ fenantreno, cada tanque mantendo a proporção de 8 L de água por animal). A água do mar foi renovada (100 %) e com adição da solução de fenantreno a cada 24 h a fim de manter a qualidade da água e restabelecer os níveis de fenantreno durante as 96 h de exposição. O grupo controle foi sujeito às mesmas condições, exceto pela adição de 0,01% de DMSO ao invés de fenantreno. Os animais não foram alimentados durante este período, a fim de evitar o potencial de bioacumulação de fenantreno pelos alimentos. Após 24 e 96 h, 10 vieiras de cada grupo foram retiradas, as brânquias foram imediatamente excisadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posteriores ensaios bioquímicos e moleculares.

Após 96 h de exposição ao fenantreno, um sistema de depuração foi estabelecido (DEP). Os animais foram alimentados com a dieta de manutenção e a água do mar foi renovada uma vez ao dia (100 %). DMSO e fenantreno não foram adicionados aos tanques neste período.

Depois do período de DEP (96 h), 10 vieiras por grupo foram dissecadas e as brânquias foram armazenadas como descrito anteriormente.

Concentração de fenantreno nos tecidos

Para confirmar a bioacumulação de fenantreno nos tecidos e a capacidade de desintoxicação das vieiras, as amostras de tecidos moles inteiros (*pools* de 10 indivíduos por grupo após 96 h de exposição e período de DEP) foram analisados pelo método de McLeod et al., (1985) com pequenas modificações. Resumidamente, as amostras foram congeladas a seco, homogeneizadas e 1g de cada uma das amostras foi extraída com uma mistura de n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em Soxhlet por 8 horas. Antes da extração foram adicionados d8-naftaleno, d10-acenafteno, d10-fenantreno, d12-criseno e d12-perileno assim como as amostras e o material de referência padrão (2974a SRM – Tecido orgânico liofilizado de *Mytilus edulis*) do NIST - *National Institute of Standards and Technology* dos EUA. Os hidrocarbonetos extraídos passaram por cromatografia em coluna de sílica gel-alumina e foram analisadas quantitativamente por um cromatógrafo de gás, *Agilent 6890*, acoplado a um espectrômetro de massa 5973N (GC/MS) selecionado no modo de íon (SIM). A coluna capilar de filme HP5MS de 25 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura, foi programado de 40 °C a 60 °C, a 20 °C min^{-1} , de 60 °C a 300 °C, a 4 °C min^{-1} e mantida a 300 °C durante 10 min em GC/MS. O fenantreno foi analisado quantitativamente com base no tempo de retenção do padrão de certificação e massa na razão (m/z) do íon de quantificação. O limite de detecção do método foi de 3,48 ng fenantreno g^{-1} e a sua recuperação variaram entre 95 e 105 %.

Ensaio enzimáticos

Amostras de brânquia de todos os grupos (n=10) foram pesadas e individualmente homogeneizadas na razão de 1:4 (p:v) em solução tampão (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, contendo 0.5 M sacarose, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.15 M KCl, 0.1 mM PMSF) usando um homogeneizador *Tissue-TearorTM*. Após a homogeneização, foi realizada uma centrifugação a 9.000g por 30 min a 4°C, seguido por outra centrifugação do sobrenadante a 100.000g por 1 h a 4 °C para obtenção da fração citosólica (sobrenadante).

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada através da decomposição do H_2O_2 pelo decréscimo da absorbância à 240nm, de

acordo com Beutler (1975). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da redução do citocromo c na presença do sistema gerador de O_2^- (xantina/xantina oxidase) a 550 nm (McCord and Fridovich, 1969). A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi mensurada pela taxa de oxidação do NADPH a 340 nm usando hidroperóxido de cumeno como substrato, de acordo com Wendel (1981). Glutathiona redutase (GR) foi quantificada pela taxa de oxidação de NADPH a 340 nm na presença de glutathiona oxidada (Carlberg e Mannervik, 1985). A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada pelo aumento da absorvância a 340 nm causada pela redução do $NADP^+$ a NADPH na presença de glicose-6-fosfato (Glock and McLean 1953). A atividade da GST foi determinada de acordo com Keen et al. (1976); o método é baseado na conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a glutathiona, monitorado a 340 nm. Proteínas totais foram quantificadas de acordo com Bradford (1976) usando albumina de soro bovino para padronização.

Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica nas brânquias de vieiras foram avaliados pela quantificação do produto formado pela reação de malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA). Para esta análise, 100 mg de cada amostra ($n = 10$) de tecido foram homogeneizados em 0,3 mL de tampão Tris 0,1 M (pH 8.0). Em seguida, 40 mg de TBA foi dissolvido em 10 mL de HCl 0,2 M e 0,3 mL desta solução foi adicionada em cada amostra. Esta mistura foi aquecida a 90 °C por 40 min. Após, 1 mL de n-butanol foi adicionado e as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 3 min. O sobrenadante foi coletado e quantificado por cromatografia líquida de alta performance a 532 nm, e o malondialdeído (MDA) em termos de curva padrão de calibração foi preparado previamente usando os mesmos procedimentos (Arantes Felfício et al., 2015).

Seleção dos genes e níveis de transcrição

Os seguintes genes de interesse foram selecionados a partir do transcriptoma de *N. nodosus* (manuscrito em preparação): *CYP1A1-like*, *CYP1A5-like*, *CYP2D20-like*, *CYP2J6-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, *CYP3A25-like*, *CYP3A29-like*, *FABP-like*, *GST_omega-like*, *SULT1B1-like*, *SULT1C1-like*, *SULT4A1-like* e *FMO-like*. Os iniciadores foram desenhados através do software Oligo Analyzer® e

Primer Quest® (IDT, <http://idtdna.com>) baseado nas sequências de mRNA completas ou parciais. A sequência dos iniciadores está descrita na tabela 1.

O RNA total foi extraído dos tecidos (n = 10) usando *Qiazol Lysis Reagent* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante (Qiagen, 2009a). A concentração e pureza do RNA foram mensurados usando espectrofotômetro *Nanodrop*® ND-1000 (*Thermo Scientific*). A transcrição reversa foi realizada com o Kit *QuantiTect*® *Reverse Transcription* (Qiagen 2009b), usando 1 µg do RNA total. A quantificação do DNA complementar (cDNA) de cada amostra foi realizada através do espectrofotômetro *Nanodrop*® ND-1000 (*Thermo Scientific*) a 260 nm e diluído com água livre de DNase e RNase (*RNase free - Sigma*). O cDNA foi aliquoteado e armazenado em freezer -20°C.

As reações de real-time (qPCR) foram realizadas com 100 ng de cDNA por reação, seguindo o protocolo do kit *QuantiFast*® *SYBR*® *Green* PCR (Qiagen, 2011), usando o rotor *Real-time cycler Rotor Gene Q* e *Rotor Gene 6000 software*. As condições de amplificação foram definidas da seguinte forma: temperatura inicial de ativação (95 °C por 5 min), desnaturação (95 °C por 10 s), anelamento/extensão (60 °C por 30 s). Para todas as reações, foram realizados 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. As amostras foram verificadas em gel de eletroforese para checagem de uma única banda sem a presença de dímeros. A taxa de expressão relativa do mRNA de cada gene foi analisada usando a eficiência do método $2^{-\Delta C_t}$, normalizado pela média geométrica de dois genes de referência, fator de alongação (*Efl-like*) e proteína ribossomal 40s (*40s-like*) (Hellemans et al., 2007; Schmittgen and Livak, 2008).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para análise de qPCR e amplificação dos genes de referência (*) e genes alvo, com a abreviação e tamanho do amplicon (pb).

Nome do gene	Sequência do iniciador 5'- 3'	Tamanho do amplicon (pb)
<i>40s-like*</i>	F - GCTTAGATGTGCTTGCCCTGAAAGAG	131
	R - GTGGACACCATCAGCTTTGCGTTTA	
<i>Ef1-like*</i>	F - CAAGGTCAGAGTATTGCCATCAC	96
	R - CGGTCAACACAGGATAAAGGATGTC	
<i>CYP1A1-like</i>	F - AAGGAAAGAAGCCGAGGAGGAAGATG	111
	R - CTGGAGGTATCAAATCCCGCCAAGAA	
<i>CYP1A5-like</i>	F - CCGCTTCTTCTACAACCTCATCC	100
	R - GCCTGCCTTACTGACTTGGTATTG	
<i>CYP2D20-like</i>	F - CCACAACAACCCGTCCAAGACAAAC	135
	R - CCCATCCGAAGAACCTCCATGATGA	
<i>CYP2J6-like</i>	F - GCCTCATCTAACAGGGACACTAACT	141
	R - GGAAACAGCAGGTCAACCATTGATA	
<i>CYP2U1-like</i>	F - CGATCCGTTCCGTAACCTTTGCCATC	99
	R - CAACTCTGTCCACCCGATCCTGAAATA	
<i>CYP3A11-like</i>	F - CAAGGAGACAGGTCGACGTGATT	95
	R - TGTGATCTGAGGAACCGTTGCTTTC	
<i>CYP3A25-like</i>	F - CCAGAGAAGTATGACCCAGAAAGA	138
	R - AATTGAAATCTTGAGTTCCAGGAGAG	
<i>CYP3A29-like</i>	F - ACACTCTCAAGAAGACAGCCAGAAC	120
	R - GGATACCGAAAGCCGTGGAACCTGATTA	
<i>FABP-like</i>	F - GATTGGAGAGGAGTTTGATGAAGT	86
	R - AGTGAACAAGTGAACCATCTTCTAT	
<i>GST_omega-like</i>	F - CTCTATCTTCTTGTGTGCCAATACC	120
	R - TCATTCTCTAAGGGTTCGGAGTTT	
<i>SULT1B1-like</i>	F - GGATTGCTGCTGCCATCTAACGAAATC	132
	R - AGGAACTGACCATGACTCTGCTTTGT	
<i>SULT1C1-like</i>	F - AGCAGGTACACATTGGGTATCGGAAAT	124
	R - GATGGCATCAAGACATTCAGGTGTTCCG	
<i>SULT4A1-like</i>	F - CGTACTGGCACATTGAACTATCACG	148
	R - TCCCTTTACCGTTCCCTCATCTCTTC	
<i>FMO-like</i>	F - GTGACACTCTGACGAGAGGAATGGAAAAG	85
	R - AAATGACGAAGAAGTGACGGTGGACA	

Análise estatística

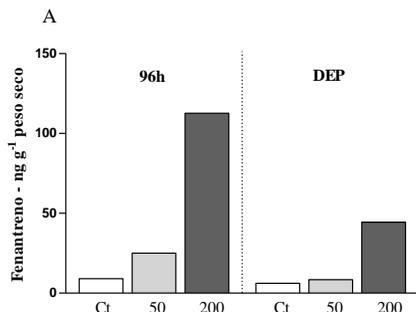
Todos os parâmetros foram previamente checados, normalidade (teste de Shapiro-Wilks), homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e os outliers foram excluídos de acordo com o teste de Grubbs. Quando necessário, os dados foram normalizados usando a transformação logarítmica ($Y = \log(Y)$) (Zar, 1999). Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey para avaliar qualquer diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para dados não paramétricos, seguido do teste de Dunns. Os resultados serão apresentados com média \pm desvio padrão (SD).

Resultados

Concentração de fenantreno nos tecidos

Os níveis de fenantreno detectados nos tecidos das vieiras (ng^{-1} peso seco) expostas à concentração nominal de 50 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno após 96 h foram 2,7 vezes e 12,5 vezes maior do que o grupo controle (9.00 ng g^{-1} peso seco), respectivamente (Fig.1). Após a DEP, os níveis de fenantreno diminuíram 2,9 e 2,5 vezes nos tratamentos 50 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno, respectivamente, em relação ao grupo de 96 h de exposição (Fig. 1). Os organismos expostos à concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno e submetidos à depuração por 96 h demonstraram valores próximos ao grupo controle, enquanto os animais expostos à concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno seguidos de DEP apresentaram níveis 4,9 vezes mais altos do que o grupo controle (Fig. 1).

Fig. 1 – Níveis de fenantreno (ng g^{-1} peso seco) detectado em tecidos moles de vieiras provenientes do grupo controle (Ct) e expostos (50 and $200 \mu\text{g L}^{-1}$), após 96 h de exposição e depuração (DEP), $n = 1$ pool de 10 animais por grupo.



Efeitos do fenantreno nos níveis de transcrição dos genes em brânquias

Três genes envolvidos na fase I de biotransformação demonstraram aumento nos níveis de transcrição nas brânquias das vieiras expostas à concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno após 24 e 96 h de exposição, quando comparados ao grupo controle: *CYP2D20-like* apresentou um aumento de 2,95 vezes e 5,6 vezes (Fig. 2A), respectivamente, assim como *CYP2UI-like*, um aumento de 2,05 e 2,4 vezes (Fig. 2B). Os níveis de *CYP3A11-like* somente apresentaram um aumento após a exposição à maior concentração de fenantreno após 96 h (Fig. 2C), enquanto as outras isoformas de CYPs (*CYP3A29-like*, *CYP3A25-like*, *CYP2J6-like*, *CYP1A5-like*, *CYP1A1-like* permaneceram inalteradas (dados não apresentados).

Em relação à fase II de biotransformação, os níveis de transcritos do gene *GST_omega-like* aumentaram 1,6 e 2,3 vezes após 24 e 96 h de exposição à maior concentração de fenantreno, respectivamente (Fig. 2D). Respostas similares foram observadas no gene *SULT1B1-like* que apresentou aumentos nos níveis de transcritos de 7,8 e 11,4 vezes nas mesmas condições de exposição (Fig. 2E). Este gene também apresentou aumento no grupo exposto por 96 h à menor concentração de fenantreno (Fig. 2E). Duas outras isoformas de sulfotransferase, *SULT1C1-like* e *SULT4A1-like* permaneceram inalteradas após a exposição, assim como FMO e FABP (dados não apresentados).

A depuração causou um restabelecimento dos níveis de transcritos em todos os genes que apresentaram aumentos em seus

níveis após a exposição, exceto *SULT1B1-like* que permaneceu alto (5,95 vezes, Fig. 2E) em relação ao controle. Além do mais, os níveis de *SULT4A1-like* apresentaram redução dos níveis após a DEP no grupo exposto previamente à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno (3 vezes, Fig. 2F).

Efeito do fenantreno nas respostas bioquímicas: enzimas e peroxidação lipídica

Vieiras expostas à maior concentração de fenantreno por 96 h apresentaram maior atividade de GPx (1,34 vezes, Fig. 3A) e GR (1,7 vezes, Fig. 3B). Também foi observado um aumento da atividade de G6PDH nas vieiras expostas à menor concentração de fenantreno por 24 h e nos organismos DEP por 96 h (1,24 vezes, Fig. 3E). DEP foi capaz de restabelecer as atividades GPx e GR (Fig. 3A e 3B). Curiosamente, as vieiras expostas à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno por 96 h e depuradas, demonstraram aumento da atividade da CAT em 1,66 vezes (Fig. 3C) e redução da atividade da SOD em 1,2 vezes (Fig. 3D). A atividade da G6PDH sofreu um aumento considerável (1,2 vezes, Fig. 3E) após a DEP no grupo previamente exposto à 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ fenantreno. A atividade da GST não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Fig. 3F).

As vieiras expostas à concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno por 24 e 96 h, assim como o grupo DEP, apresentaram níveis mais baixos de peroxidação lipídica do que os respectivos controles (Fig. 3G).

Discussão

Considerando que os bivalves são organismos sésseis (ostras, mexilhões) ou organismos de baixa movimentação (vieiras), os mesmos apresentam pouca habilidade para escapar das fontes de contaminação presentes no meio ambiente aquático. Por este fato, são amplamente utilizados como organismos sentinela, visto sua capacidade de bioacumulação. Alguns autores evidenciam a baixa capacidade de metabolização de HPAs, o que reforça a importância do uso destes organismos como espécies sentinela na avaliação da contaminação das regiões costeiras (Livingstone, 1998; Snyder, 2000). Desta forma, o presente estudo demonstra dados interessantes evidenciando que vieiras *N. nodosus* adotam estratégias bioquímicas e moleculares que estão

possivelmente envolvidas na adaptação à exposição, metabolismo e depuração do fenantreno.

A vieiras bioconcentraram fenantreno em tempo e concentração dependentes, similarmente ao que foi observado em ostras *C. gasar* (Lüchmann et al., 2014). O aumento dos níveis de HPAs após a exposição já foi descrito em muitos bivalves, como em vieiras *Pecten maximus* (Hannam et al., 2010a), *Perna viridis* (Cheung et al., 2001), *Ruditapes philippinarum* (De Luca-Abbott et al., 2005; Liu et al., 2014), *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti et al., 2008) e *Chlamys islandica* (Hannam et al., 2009).

Uma importante via para captação, bioconcentração, metabolismo e excreção de HPAs são as brânquias, que possuem ampla superfície de contato direto com a água. Neste contexto, é esperado que este tecido possua um sistema de modulação bioquímico e molecular mais rapidamente responsivo do que a glândula digestiva, por exemplo. Este fato foi demonstrado por Pan et al., (2009) em vieiras expostas ao benzo[a]pireno e por Trevisan et al., (2012) em ostras expostas ao CDNB. Assim, a brânquia pode ser considerada um alvo para vários poluentes presentes no meio aquático, o que pode afetar diferentes vias metabólicas e celulares.

Fig. 2 – Níveis normalizados da transcrição de genes de biotransformação A – *CYP2D20-like*, B – *CYP2U1-like*, C – *CYP3A11-like*, D – *GST_omega-like*, E – *SULT1B1-like*, F – *SULT4A1-like* em brânquia de vieiras *N. nodosus* expostas ao fenantreno por 24 h, 96 h e depuração por 96 h (DEP). Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição dos tratamentos – concentração 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (50) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (200) – em relação ao controle (Ct). Para cada tempo de exposição (24 h, 96 h or DEP), grupos não compartilhando letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$), $n = 10$ animais por grupo. *CYP3A29-like*, *CYP3A25-like*, *CYP2J6-like*, *CYP1A5-like*, *CYP1A1-like*, *FABP-like* e *FMO-like* não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

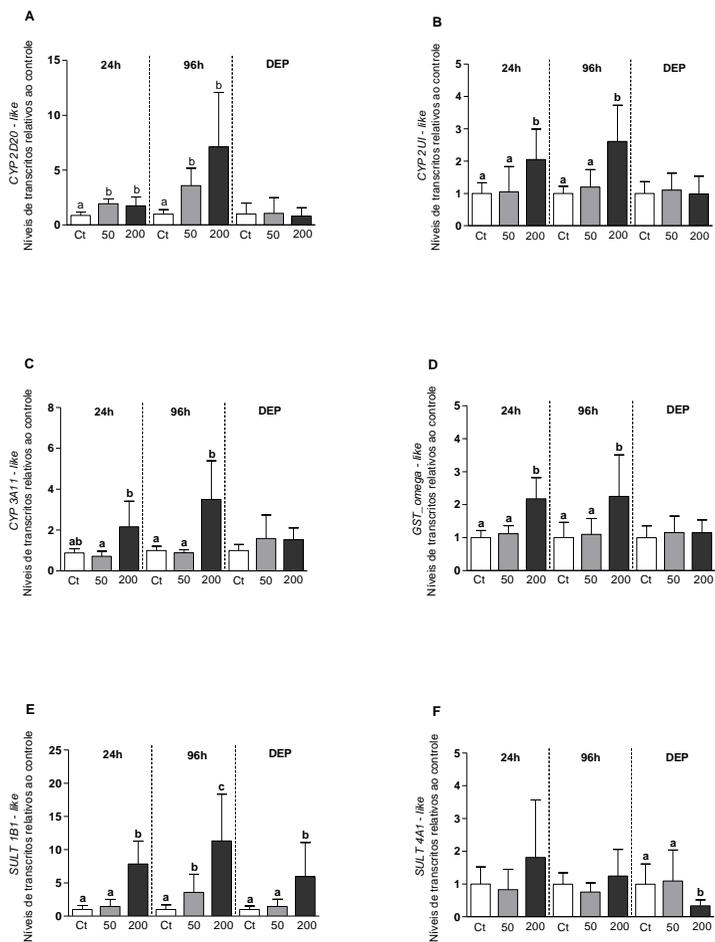
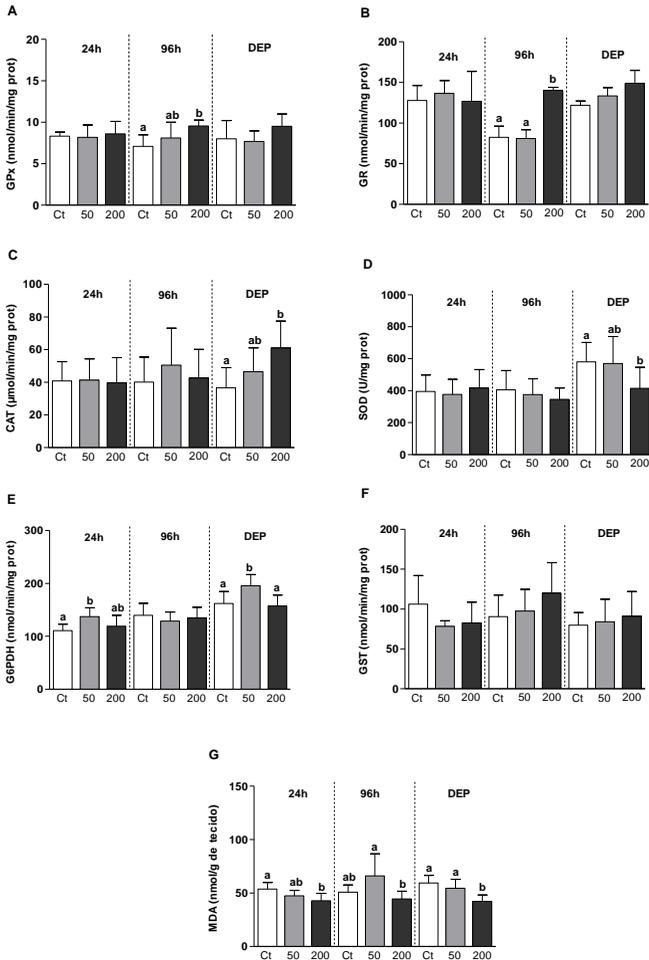


Fig. 3 – Atividade enzimática da A - glutaciona peroxidase (GPx), B - glutaciona redutase (GR), C - catalase (CAT), D - superóxido dismutase (SOD), E - glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), F - glutaciona S-transferase (GST) e G - nível de malondialdeído (MDA) em brânquias de vieiras *N. nodosus* expostas ao fenantreno por 24 h, 96 h e depuradas (DEP). Os dados são expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – concentração 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (50) e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (200) – em relação ao controle (Ct). Para cada tempo de exposição (24 h, 96 h or DEP), grupos não compartilhando letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$), $n = 10$ animais por grupo.



Neste estudo foi analisada a transcrição de oito genes da família CYP em brânquias de vieiras expostas ao fenantreno. Três deles, *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like* e *CYP3A11-like*, apresentaram aumentos significativos nos níveis de transcrição quando foram expostas à maior concentração de fenantreno por 24 e 96 h, em relação ao grupo controle. Efeitos similares foram observados na transcrição do gene *CYP2D20-like* mesmo quando o animal foi exposto à menor concentração. Estes dados indicam que o fenantreno ativou a transcrição de diferentes enzimas de fase I, possivelmente para aumentar a capacidade de metabolização e depuração. Corroborando com esta hipótese, os níveis de transcrição dos genes *GST_omega-like* e *SULT1B1-like* também foram regulados positivamente nas brânquias das vieiras expostas por 24 e 96 h à 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno (Fig. 2D e E).

A biotransformação de xenobióticos pode causar a produção de EROS, que também são geradas através do metabolismo aeróbio, cadeia de transportadora de elétrons, atividade enzimática e reações imunológicas (Giuliani et al., 2013). Curiosamente, os níveis de MDA diminuíram após 24 h de exposição à mais alta concentração de fenantreno, permanecendo baixa ainda mesmo após a DEP. Este padrão também foi reportado em outras espécies aquáticas expostas à misturas de HPAs (Arantes Felício et al., 2015; Nogueira et al., 2015) e por danos oxidativos provocados ao longo do tempo (Ansaldò et al., 2005; Lüchmann et al., 2011, 2014). Ao mesmo tempo, a ausência de aumento nos níveis de MDA, juntamente com a bioacumulação do fenantreno pode indicar uma baixa toxicidade aguda desde composto em *N. nodosus*. Por outro lado, diferentes tipos de aldeídos desidrogenases e alguns outros produtos de aldeídos são capazes de reduzir o MDA provenientes da peroxidação lipídica a seus correspondentes alcoóis, sugerindo um papel fisiológico potencial para estas enzimas detoxificarem os aldeídos citotóxicos (Janero, 1990). Estudos prévios demonstraram que uma possível via bioquímica para a degradação e excreção do MDA envolve a oxidação por aldeído desidrogenase mitocondrial, seguido de descarboxilação para produção de acetaldeído, CO_2 e H_2O (Siu and Draper, 1982; Esterbauer et al., 1991). Baseado nisto, nós sugerimos que a exposição ao fenantreno pode ter induzido a aldeído desidrogenase, que, por sua vez, pôde decompor o MDA e transformá-lo em alcoóis solúveis a serem excretados pelas brânquias. Esta hipótese é corroborada ao fato do gene aldeído desidrogenase ter sido identificado na lista dos genes que tiveram seus níveis aumentados em ostras *C. gasar* expostas ao fenantreno (comunicação pessoal). Da mesma forma, a aldeído desidrogenase tipo mitocondrial foi identificada

no grupo de genes que apresentaram aumentos nos níveis de transcrição de vieiras expostas *in situ* à água de descarte em plataformas de exploração de petróleo (Wendt et al., manuscrito em preparação).

O fenantreno provocou um aumento na atividade de três enzimas antioxidantes relacionadas ao sistema glutathiona, nomeadas GR, GPx e G6PDH. Este cenário aponta para um aumento da glutathiona reduzida, detoxificação de peróxidos e consumo de NADPH, provavelmente ocasionados pelo aumento da produção de EROS durante o metabolismo do fenantreno. Sabe-se que o sistema GPx é essencial para a proteção contra peróxidos em bivalves e que danos no sistema auxiliar (como o ciclo da GR) podem diminuir a detoxificação de peróxidos orgânicos e aumentar a susceptibilidade animal ao estresse oxidativo em mexilhões (Trevisan et al., 2014a, 2014b). GST, outra enzima que confere proteção celular durante a exposição ao fenantreno, não apresentou diferenças em sua atividade após a exposição, indo de acordo com estudos prévios realizados com *Nacella concinna*, *Mytilus galloprovincialis* e *C. brasiliensis* (Ansaldi et al., 2005; Lüchmann et al., 2011; Trisciani et al., 2012). A atividade da GST em bivalves marinhos já foi observada em alguns estudos e os resultados demonstraram tanto o aumento quanto a redução de sua atividade perante xenobióticos. Estes resultados controversos podem ser explicados pelo efeito inibitório causado por altas concentrações de poluentes, ou alternativamente, uma resposta adaptativa da via de detoxificação da GST que precisaria ser melhor estudada (Pan et al., 2009). Além do mais, a atividade da GST foi analisada utilizando o substrato CDNB, que quantifica a atividade total da enzima. Este protocolo não permite identificar a ativação ou inativação das isoformas da GST especificamente (Trisciani et al., 2012). Portanto, esta lacuna na resposta enzimática da GST após exposição ao fenantreno não significa que as isoformas da GST não são responsáveis ao fenantreno. Estes resultados poderiam ser melhor averiguados utilizando substratos específicos para cada isoforma de GST. De fato, aumentos nos níveis de transcritos do gene *GST_omega-like* (~2 vezes) foram observados nas vieiras expostas por 24 e 96 h à maior concentração de fenantreno.

Interessante notar que a atividade enzimática foi modulada após 96 h de exposição ao fenantreno, sugerindo que 24 h pode não ter sido tempo suficiente para ativar o sistema de defesa antioxidante, exceto para a atividade da G6PDH. Embora a G6PDH seja responsável à produção de NADPH, esta enzima está relacionada com o metabolismo da glicose e, provavelmente, com os períodos de alimentação e jejum. As vieiras não foram alimentadas durante a exposição ao fenantreno,

sendo alimentadas novamente somente no período de DEP. Embora este cenário possa afetar o metabolismo energético, não podemos considerar este fator como uma regra geral, pois estudos reportaram tanto a redução da atividade da G6PDH como a ausência de diferenças significativas durante a privação de alimentação em ostras e fígado de peixe (Lüchmann et al., 2011; Morales et al., 2004).

Em nosso estudo analisamos a expressão do mRNA de genes relacionados à detoxificação do fenantreno em brânquias de vieiras. Apesar da família CYP1A apresentar um papel importante neste mecanismo e ser o mais importante e estudado gene relacionado com a detoxificação química via receptor aril hidrocarboneto (AhR) (de Toledo-Silva et al., 2008; Goldstone and Stegeman, 2006; Zanette et al., 2013), os níveis de transcritos dos genes *CYP1A1-like* e *CYP1A5-like* não apresentaram diferenças significativas. Porém, a interpretação dos resultados relacionados aos CYP1As tem sido dificultada pela baixa atividade catalítica das enzimas microsossomais e a falta de reatividade cruzada de anticorpos específicos para estas proteínas em bivalves (Zanette et al., 2013). Nossos resultados estão de acordo com Akcha et al. (2000) que demonstraram que os níveis do gene *CYP1A1-like* não apresentaram diferenças significativas quando analisados em glândula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* expostos ao benzo[a]pireno. Zanette et al., (2013) também não verificaram diferenças significativas nos níveis de expressão do mRNA dos genes *CYP1-like* e *CYP3-like* em glândula digestiva de *Mytilus edulis* após a injeção de agonistas do AhR.

Outra família igualmente importante é conhecida como CYP2, e atua na biotransformação de compostos orgânicos (Kim et al., 2014). CYP2 também foi reportada previamente em mamíferos, peixes e moluscos (Goldstone et al., 2010; Kubota et al., 2013; Lüchmann et al., 2014; Peters et al., 1998). De acordo com o papel de detoxificação da família CYP2, os níveis de mRNA dos genes *CYP2D20-like* e *CYP2UI-like* apresentaram um aumento significativo nas brânquias de vieiras após 24 e 96 h de exposição ao fenantreno. Importante notar que após a DEP, os níveis de transcritos de ambos os genes foram semelhantes ao controle. Estes resultados confirmam o papel de CYP2 na detoxificação de xenobióticos e o uso destes genes como biomarcadores de exposição de HPAs em bivalves. A família CYP3 é conhecida por metabolizar uma série de substratos como xenobióticos, ácidos biliares, hormônios endógenos e prevenir a bioacumulação de substâncias lipofílicas (Tian et al., 2014). Em nosso estudo, *CYP3A11-like* apresentou um aumento nos níveis de transcritos após 96 h de exposição à maior concentração de fenantreno, retornando aos níveis basais após a DEP. Comparando com

estudo anteriores, podemos observar uma discrepância nos resultados relatados por diversos autores. Alguns autores demonstram um moderado aumento nos níveis de transcritos de genes pertencentes à família CYP3, assim como outros não constataram mudanças significativas em peixes e bivalves expostos à contaminantes orgânicos (Della Torre et al., 2010; Zanette et al., 2013; Han et al., 2014; Lüchmann et al., 2014). Uma possível explicação para estes diferentes resultados seria os diferentes tecidos estudados, o tempo e a concentração de exposição. Enquanto alguns estudos demonstraram aumentos, assim como redução nos níveis de transcrição ou até mesmo ausência de diferenças significativas na expressão dos CYPs (Toledo-Silva et al., 2008; Lacroix et al., 2014; Tian et al., 2014), tais divergências ainda carecem de uma explicação mecanicista que poderá apoiar a conclusão dos resultados (Zanette et al., 2013). Outro gene da fase I de biotransformação analisado em nosso estudo foi o *FMO-like*. Este gene não apresentou qualquer diferença significativa após a exposição ao fenantreno, como verificado também por Boutet et al., (2004a) em brânquia de *C. gigas* expostas à pesticidas e hidrocarbonetos. Schlenk & Buhler, (1989) detectaram a atividade da enzima FMO em brânquia de *C. gigas*, enquanto Boutet et al., (2004a) apresentaram um aumento nos níveis de transcritos na glândula digestiva de *C. gigas* expostas à HPAs e demonstraram que os níveis de FMO eram normalmente maiores na glândula digestiva, fígado e hepatopâncreas, do que em outros tecidos. Após a fase I, os metabólitos são geralmente conjugados à compostos endógenos pelas enzimas da fase II de biotransformação, como as isoformas de GST, que promovem a regulação diferencial (Lacroix et al., 2014). Como afirmado anteriormente, um aumento nos níveis de mRNA do gene *GST_omega-like* (~2 vezes) foi observado nas vieiras expostas por 24 e 96 h à maior concentração de fenantreno. O aumento nos níveis de transcritos da *GST_omega* também foi identificado em ostras expostas à hidrocarbonetos (Boutet et al., 2004b, Luchmann et al., 2014), esgoto doméstico (Medeiros et al., 2008a) e em zebra *mussel* transplantado (Châtel et al., 2015). Também é sugerido que esta isoforma de GST esteja envolvida no sistema de defesa antioxidante (Medeiros et al., 2008a; Rola et al., 2012), que pode ser muito importante durante a exposição à HPAs.

Sulfotransferases citosólicas pertencem a uma superfamília de enzimas multifuncionais de fase II, que catalisam a conjugação de sulfatos no metabolismo de xenobióticos e compostos endógenos (Michio and Hiroshi, 1994). Existem poucos estudos com estas

proteínas em bivalves. Wang et al., (2012) sugeriram que a SULT pode ser um gene relacionado com o crescimento em vieiras e Jia et al., (2009) relataram a SULT em resposta ao estresse, em abalone. Os níveis de transcritos da *SULT1C1-like* não apresentaram diferenças significativas no presente estudo, assim como em ostras *C. brasiliana* provenientes de um local contaminado por esgoto doméstico, no sul do Brasil (dados não publicados). No entanto, *SULT1B1-like* apresentou um grande aumento nos níveis de transcritos após exposição ao fenantreno, assim como também foi observado um aumento nos níveis deste gene após exposição de bivalves ao benzo[a]pireno (Milan et al., 2013; Tian et al., 2013; Liu et al., 2014). Os níveis de transcritos deste gene permaneceram elevados mesmo após o período de depuração nos organismos expostos à maior concentração, e sugerimos que ele represente um papel importante na detoxificação de fenantreno nas brânquias.

Outro gene investigado em nosso estudo foi a FABP, uma pequena proteína citosólica (14-15 KDa) que pertence a uma família multigênica de proteínas lipídicas intracelulares. As FABPs presentes em vertebrados estão envolvidas como o metabolismo energético, crescimento, desenvolvimento e transporte de ácidos graxos entre as membranas, porém outras funções biológicas necessitam ser investigadas, como a participação na transdução de sinal, regulação da expressão gênica e envolvimento no metabolismo de xenobióticos (Medeiros et al., 2008b). Os níveis de mRNA da FABP não apresentaram diferenças significativas em nosso estudo, no entanto, apresentou um aumento dos níveis em brânquias de *C. brasiliana* (dados não publicados) e *C. gigas* expostas ao esgoto doméstico (Medeiros et al., 2008b). Contrariamente, Bain (2002) reportou uma inibição dos níveis de FABP em coração de peixe expostos ao pireno. O papel da FABP ainda não é totalmente claro quando relacionamos a exposição de bivalves à xenobióticos.

Como outros bivalves, as vieiras são capazes de eliminar os HPAs de seus tecidos quando em contato com água do mar em condições capazes de maximizar sua atividade de filtração. O presente estudo utilizou um sistema fechado de depuração para avaliar a capacidade de detoxificação das vieiras. A depuração causou uma redução da concentração de fenantreno de 2,9 e 2,5 vezes após 96 h de exposição à ambas concentrações, respectivamente, assim como as concentrações retornaram aos níveis basais na maioria dos parâmetros alterados pela exposição ao fenantreno. A redução dos níveis de fenantreno aumenta o poder de recuperação do animal, diminui a

sinalização da transcrição de genes e produção de EROS devido à redução da biotransformação de fenantreno. Além do mais, ao final do período de depuração, as vieiras ainda apresentavam modulação dos principais mecanismos de defesa celular, como baixos níveis de transcritos do gene *SULT4A1-like* e atividade da SOD, bem como o aumento da atividade da CAT e G6PDH. Alguns destes conjugados de sulfato são conhecidos por se tornarem tóxicos ou farmacologicamente ativos (Michio and Hiroshi, 1994), o que pode levar à redução dos níveis de mRNA das SULTs (Chapman et al., 2004) e da atividade enzimática (Janer et al., 2005). A redução da atividade da SOD paralelamente ao aumento da atividade da CAT, sugere um esforço para estabilizar a concentração de H₂O₂ minimizando o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (Ameur et al., 2015). Além disso, em baixas concentrações de H₂O₂, a CAT modula a detoxificação de outros substratos, como fenóis e álcoois, através de reações ligadas à redução de H₂O₂ (Regoli and Giuliani, 2013).

Este estudo sugere que as vieiras podem adotar algumas estratégias para metabolizar, eliminar e sobreviver na presença de fenantreno. A transcrição de genes associados aos parâmetros celulares desenvolveu um papel importante na caracterização de mecanismos de detoxificação em bivalves. O fenantreno foi responsável por alterações na estabilidade da membrana e em importantes genes relacionados com a biotransformação. A indução de genes de biotransformação de fase I e II durante a exposição ao fenantreno está possivelmente associada à redução dos níveis de fenantreno nos tecidos das vieiras que passaram pelo processo de depuração. Depuração em água limpa associada à alimentação pode ser um método efetivo para minimizar os efeitos induzidos por HPAs e promover a excreção destes compostos pelas brânquias de vieiras *N. nodosus*.

Referências

Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.-F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels *Mytilus Galloprovincialis*. **Aquat.Toxicol.** 49, 269–287, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00082-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00082-X).

Ameur, W., Ben, El, Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., mEnnaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D.,

Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Driss, M.R., Borràs, M., 2015. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere** 135, 67–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050>.

Ansaldo, M., Najle, R., Luquet, C.M., 2005. Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Mar. Environ. Res.** 59, 381–390, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.06.003>.

Arantes Felício, A., Martins Parente, T.E., Regina Maschio, L., Nogueira, L., Rodrigues Venancio, L.P., de Freitas Rebelo, M., Schlenk, D., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses, morphometric changes, genotoxic effects and CYP1A expression in the armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* after 15 days of exposure to mineral diesel and biodiesel. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 115, 26–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.034>.

Bain, L.J., 2002. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Mar. Environ. Res.** 54, 379–383, [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00130-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00130-7).

Bayır, M., Bayır, A., Wright, J.M., 2015. Divergent spatial regulation of duplicated fatty acid-binding protein (FABP) genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics** 14, 26–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2015.02.002>.

Beutler, E., 1975. **Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods**. Grune & Stratton, New York.

Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F., 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquat. Toxicol.** 89, 257–266, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.011>.

Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Biochim. Biophys. Acta** 1679, 29–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.04.001>.

Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene** 329,147–157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.027>.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. **Meth. Enzymol.** 113,484–490, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4).

Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Gourlay-Francé, C., Pfohl-Leszkowicz, A., Vincent-Hubert, F., 2015. Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 114, 241–249, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.023>.

Chapman, E., Best, M.D., Hanson, S.R. and Wong, C.-H., 2004. Sulfotransferases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. **Angewandte Chemie International Edition**, 43: 3526–3548. [10.1002/anie.200300631](http://dx.doi.org/10.1002/anie.200300631).

Cheung, C.C., Zheng, G., Li, A.M., Richardson, B., Lam, P.K., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels *Perna Viridis*. **Aquat. Toxicol.** 52,189–203, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00145-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00145-4).

Cranford, P.J., 2006. Scallops: biology, ecology and aquaculture, developments in aquaculture and fisheries science, developments. In:

Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-9309\(06\)80040-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-9309(06)80040-2).

De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. **Mar. Pollut. Bull.** 51, 694–707, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.01.010>.

Della Torre, C., Corsi, I., Nardi, F., Perra, G., Tomasino, M.P., Focardi, S., 2010. Transcriptional and post-transcriptional response of drug-metabolizing enzymes to PAHs contamination in red mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758): a field study. **Mar. Environ. Res.** 70, 95–101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.03.009>.

Einsporn, S., Koehler, A., 2008. Immuno-localisations (GSSP) of subcellular accumulation sites of phenanthrene, aroclor 1254 and lead (Pb) in relation to cytopathologies in the gills and digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. **Mar. Environ. Res.** 66, 185–186, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.053>.

Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Rad. Biol. Med.** 11, 81–128, [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).

FAO, 2008. Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L. **Bivalve depuration: fundamental and practical aspects**. Fisheries Technical Paper n. 511.

Freites, L., García, N., Troccoli, L., Maeda-Martínez, A.N., Fernández-Reiriz, M.J., 2010. Influence of environmental variables and reproduction on the gonadal fatty acid profile of tropical scallop *Nodipecten nodosus*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.** 157, 408–414, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.09.001>.

Glock, G.E., McLean, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.** 55, 400–408.

Goldstone, H.H., Stegeman, J., 2006. A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: gene duplication gene conversion, and positive

selection. **J. Mol.Evol.** 62, 708–717, <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-005-0134-z>.

Goldstone, J., McArthur, A., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jonsson, M., Nelson, D., Stegeman, J., 2010. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. **BMC Genomics** 11, 643.

Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Dailianis, S., 2012. Total thiol redox status as a potente biomarker of PAH-mediated effects on mussels. **Mar. Environ. Res.** 81, 26–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.08.004>.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985. Free radicals in biology and medicine. **J. FreeRadic. Biol. Med.** 1, 331–332 [http://dx.doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90140-0](http://dx.doi.org/10.1016/0748-5514(85)90140-0).

Han, J., Won, E.-J., Hwang, D.-S., Shin, K.-H., Lee, Y.S., Leung, K.M.-Y., Lee, S.-J., Lee, J.-S., 2014. Crude oil exposure results in oxidative stress-mediated dysfunctional development and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus* and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes. **Aquat.Toxicol.** 152, 308–317, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.027>.

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Moody, J.A., Galloway, T.S., Jones, M.B., 2009. Immunefunction in the Arctic Scallop *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. **Aquat. Toxicol.** 92, 187–194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.010>.

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., Jones, M.B., 2010a. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere** 78, 779–784, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.049>.

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., Jones, M.B., 2010b. Functional immune response in *Pecten maximus*: combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. **Fish Shellfish Immunol.** 28, 249–252, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.018>.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesomepele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol.** 8, <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>, R19–R19.

Janer, G., Mesia-Vela, S., Kauffman, F.C., Porte, C., 2005. Sulfatase activity in the oyster *Crassostrea virginica*: its potential interference with sulfotransferase determination. **Aquat. Toxicol.** 74, 92–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.004>.

Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **FreeRad. Biol.Med.** 9, 515–540, [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2).

Jia, X., Zhang, Z., Wang, G., Zou, Z., Wang, S., Huang, B., Wang, Y., 2009. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of genes related to Tributyltin (TBT) exposure in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* **Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics** 4, 255–262, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2009.06.002>.

Jin, Q., Pan, L., Liu, T., Hu, F., 2015. RNA-seq based on transcriptome reveals differ genetic expressing in *Chlamys farreri* exposed to carcinogen PAHs. **Environ.Toxicol. Pharmacol.** 39, 313–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.019>.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **J. Biol. Chem.** 251, 6183–6188.

Kim, B.-M., Rhee, J.-S., Jeong, C.-B., Lee, S.-J., Lee, Y.S., Choi, I.-Y., Lee, J.-S., 2014. Effects of benzo[a]pyrene on whole cytochrome P450-involved molecular responses in the marine medaka *Oryzias melastigma*. **Aquat. Toxicol.** 152,232–243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.008>.

Kubota, A., Bainy, A.C.D., Woodin, B.R., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2013. The cytochrome P450 2AA gene cluster in zebrafish (*Danio rerio*): expression of CYP2AA1 and CYP2AA2 and response to

phenobarbital-type inducers. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 272, 172–179, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.017>.

Lüchmann, K.H., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Daura-Jorge, F.G., Bainy, A.C.D., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuelwater-accommodated fraction. **Aquat. Toxicol.** 105, 652–660 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.003>.

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

Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., Moraga, D., 2014. A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. **Mar. Pollut. Bull.** 86,304–313, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.049>.

Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y., Miao, J., 2014. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 107, 251–259, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.024>.

Livingstone, D., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.** 120, 43–49, [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9).

Martins, M., Costa, P.M., Ferreira, A.M., Costa, M.H., 2013. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. **Aquat. Toxicol.** 85–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.019>, 142–143.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (Hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 244, 6049–6055.

McLeod, W.D., Brown, D.W., Friedman, A.J., Burrows, D.G., Maynes, O., Pearce, R.W., Wigren, C.A., Bogar, R.G., 1985. **Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility**, 1985–1986. Extractable Toxic Organic Components, 2nd edn. NOAA Northwest Fisheries Science Center, Seattle, WA (U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memo, NMFS-F/NWC-9), p.121.

Medeiros, I.D., Siebert, M.N., de Toledo e Silva, G., Moraes, M.O., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2008a. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Mar. Environ. Res.** 66, 156–157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.048>.

Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Toledo-Silva, G., Rodrigues, T.B., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2008b. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 26, 362–365, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.05.004>.

Michio, M., Hiroshi, H., 1994. Biochemistry and molecular biology of drug-metabolizing sulfotransferase. **Int. J. Biochem.** 26, 1237–1247, [http://dx.doi.org/10.1016/0020-711X\(94\)90093-0](http://dx.doi.org/10.1016/0020-711X(94)90093-0).

Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M.G., Matozzo, V., 2013. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquat. Toxicol.** 126, 17–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.007>.

Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.** 139, 153–161, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>.

Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, A.L.M., da Silva Acosta, D., Dafre, A.L., Oliveira, T.Y.K., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. **Chemosphere** 134, 210–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.034>.

Noh, S.R., Cheong, H.-K., Ha, M., Eom, S.-Y., Kim, H., Choi, Y.-H., Paek, D., 2015. Oxidative stress biomarkers in long-term participants in clean-up work after the Hebei Spirit oil spill. **Sci. Total Environ.**, 207–214, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.039>, 515–516.

Pan, L., Ren, J., Zheng, D., 2009. Effects of benzo(a)pyrene exposure on the antioxidant enzyme activity of scallop *Chlamys farreri*. **Chin. J. Oceanol.Limnol.** 27, 43–53, <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-009-0043-x>.

Peters, L.D., Nasci, C., Livingstone, D.R., 1998. Variation in levels of cytochrome P4501A 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. **Mar. Environ. Res.** 46, 295–299, [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00117-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00117-7).

Qiagen, 2009. **QIAzol handbook: for efficient lysis of fatty tissues and all othertypes of tissue before RNA purification.** Qiagen, 2009. QuantiTect®reverse transcription handbook, 31.

Qiagen, 2011. **QuantiFast®SYBR®Green PCR KIT Quick Start Protocol 3.**

Regoli, F., Giuliani, M.E., 2013. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Mar. Environ. Res.**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>.

Rola, R.C., Monteiro, M., da, C., Reis, S.R., da, S., Sandrini, J.Z., 2012. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. **Mar. Pollut. Bull.** 64, 766–771, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.004>.

Schäfer, S., Köhler, A., 2009. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. **Mar. Environ. Res.** 68, 128–136, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.001>.

Schlenk, D., Buhler, D.R., 1989. Xenobiotic biotransformation in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.** 94,469–475, [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90100-X](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(89)90100-X).

Schlenk, D., 1998. Occurrence of flavin-containing monooxygenases in non-mammalian eukaryotic organisms. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.** 121, 185–195, [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10060-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10060-9).

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nat. Protoc.** 3, 1101–1108.

Siu, G.M., Draper, H.H., 1982. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. **Lipids** 17, 349–355.

Snyder, M., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquat. Toxicol.** 48, 529–547, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00085-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00085-0).

Tian, S., Pan, L., Sun, X., 2013. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a]pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. **Aquat. Toxicol** 144–145, 162–171, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.031>.

Tian, S., Pan, L., Zhang, H., 2014. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression modulation following exposure to benzo[a]pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. **Mar. Environ. Res.** 94, 7–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.001>.

Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T.C.M., Moraes, M.O., Goldstone, J.V., Bairy, A.C.D., 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Mar. Environ. Res.** 66, 15–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.010>.

Travers, M.-A., Meistertzheim, A.-L., Cardinaud, M., Friedman, C.S., Huchette, S., Moraga, D., Paillard, C., 2010. Gene expression patterns of abalone *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. **J. Invertebr. Pathol.** 105, 289–297, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.08.001>.

Trevisan, R., Arl, M., Sacchet, C.L., Engel, C.S., Danielli, N.M., Mello, D.F., Brocardo, C., Maris, A.F., Dafre, A.L., 2012. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to

chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquat. Toxicol.** 108, 85–93, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.023>.

Trevisan, R., Mello, D.F., Uliano-Silva, M., Delapedra, G., Arl, M., Dafre, A.L., 2014a. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Mar. Environ. Res.** 101, 81–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.004>.

Trevisan, R., Flesch, S., Mattos, J.J., Milani, M.R., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., 2014b. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 159, 22–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.007>.

Trisciani, A., Perra, G., Caruso, T., Focardi, S., Corsi, I., 2012. Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. **Mar. Environ. Res.** 79, 29–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.006>.

Wang, C., You, Y., Wang, H., Liu, B., 2012. Genetic diversity of the sulfotransferase-like gene and one non synonymous SNP associated with growth traits of clam, *Meretrix meretrix*. **Mol. Biol. Rep.** 39, 1323–1331, <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-0865-4>.

Wei, L., Hu, Z., Dong, L., Zhao, W., 2015. A damage assessment model of oil spill accident combining historical data and satellite remote sensing information: a case study in Penglai 19-3 oil spill accident of China. **Mar. Pollut. Bull.** 91, 258–271, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.036>.

Wendel, A., 1981. Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems, Methods in Enzymology Methods in Enzymology. **Elsevier**, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).

Wootton, E., Dyrinda, E., Pipe, R., Ratcliffe, N., 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. **Aquat. Toxicol.** 65, 13–25, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00098-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00098-5).

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

Zanette, J., Nunes, F.F., Medeiros, I.D., Siebert, M.N., Mattos, J.J., Lüchmann, K.H., Rodrigues de Melo, C.M., Bairy, A.C.D., 2008. Comparison of the antioxidante defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Mar. Environ. Res.** 66, 196–198, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.057>.

Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J.V., Parente, T., Woodin, B.R., Bairy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2013. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. **Aquat. Toxicol.** 101–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.017> (128–129).

Zar, J.H., 1999. **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

Zhang, H., Pan, L., Tao, Y., 2014. Toxicity assessment of environmental pollutant phenanthrene in clam *Venerupis philippinarum* using oxidative stress biomarkers. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 37, 697–704, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.018>

CAPÍTULO 2

Bioacumulação de HPAs e efeitos na transcrição de genes em vieiras *Nodipecten nodosus* expostas ao óleo cru

Rômi S. Piazza¹, Rafael Trevisan¹, Guilherme Toledo-Silva¹, Nestor Wendt¹, Jacó J. Mattos², Daína Lima¹, Satie Taniguchi³, Silvio Tarou Sasaki³, Márcia Caruso Bicego³, Afonso C. D. Bainy¹

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88034-257, Brasil

²Núcleo de Pesquisas em Patologia Aquícola – NEPAQ, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil;

³Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Resumo

A contaminação por derramamento de petróleo e por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tornou-se uma preocupação global em função dos efeitos adversos causados por estes compostos sobre os organismos aquáticos e ecossistemas. Os moluscos bivalves são comumente utilizados em estudos de biomonitoramento relacionados a HPAs, e adicionalmente, existe a necessidade de estudos que possam sugerir potenciais biomarcadores de contaminação por óleo e HPAs, especialmente em áreas de produção *offshore*. Com este propósito, o presente estudo expôs vieiras *Nodipecten nodosus* em laboratório a duas concentrações de óleo cru (E1, 0,33 g L⁻¹, e E2, 0,66 g L⁻¹) durante 24 e 96 h, seguido de análises químicas e moleculares. A análise química nos tecidos da vieira indicou que os organismos acumularam HPAs de forma tempo e concentração dependente, em que o naftaleno, fenantreno e metabólitos foram os HPAs que apresentaram os maiores níveis de bioacumulação. Os níveis de transcritos de sete genes de fase I e II de biotransformação foram analisados por qPCR nas brânquias e glândula digestiva de vieiras. Além destes, quatorze genes com variadas funções celulares relacionados com o metabolismo energético, sistema imune e reparação celular também foram avaliados. Brânquia e glândula digestiva apresentaram modulação positiva nos seguintes genes de

biotransformação em pelo menos um dos períodos de concentração e de exposição: isoformas do citocromo P450 *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, glutationa S-transferase ômega - *GST_omega-like*, isoformas de sulfotransferases *SULT1B1-like* e *SULT4A1-like*, e monoamina oxidase - *MAO-like*. Por outro lado, genes associados às funções imunes (panteteinase-like - *VNN1-like*, proteína amarela-like - *YELL-like*), metabolismo energético (fosfolipase B1 associada a membrana-like - *PLB1-like*, cAMP- proteína de ligação – elemento resposta 2-like - *CREB2-like*, subunidade de ligação ao glicogênio 76A-like - *GBS76A-like*) e reparo celular (receptor do factor de crescimento de fibroblastos 2-like - *FGFR2-like*), apresentaram aumentos nos seus níveis exclusivamente em brânquias, exceto *GBS76A-like* que também aumentou em glândula digestiva após a exposição. Os dados relatados sugerem que as vieiras apresentam capacidade de biotransformação de HPAs presentes no óleo cru e também podem desencadear uma ampla variedade de respostas celulares, como possíveis mecanismos adaptativos. O presente trabalho analisou um conjunto de 21 genes em *N. nodosus* como biomarcadores de contaminação aquática por HPAs, e o uso de brânquias e glândula digestiva como tecido alvo. Estes ensaios podem ser aplicados em programas de biomonitoramento em áreas de produção de gás e petróleo, especialmente *offshore*. Também poderá ajudar na caracterização de possíveis contaminações por HPAs nestas áreas, e monitorar a persistência, destino e efeitos destas substâncias químicas durante ou após um evento de derramamento de petróleo.

Palavras-chave: óleo cru; HPAs; bivalves; vieiras; biotransformação; citocromo P450

PAHs bioaccumulation and effects on gene transcription in scallops *Nodipecten nodosus* exposed to crude oil

ABSTRACT

Oil spill and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination have become a global concern because of its adverse effects on aquatic organisms and ecosystem. Bivalves are one of the most commonly used organisms in PAH-related biomonitoring studies, yet additional data

remain necessary to suggest potential biomarkers of oil and PAH exposure, especially in offshore areas with oil activity. For this purpose, the present study exposed scallops *Nodipecten nodosus* in laboratory to two crude oil concentrations (E1, 0.33 g L⁻¹, and E2, 0.66 g L⁻¹) for 24 and 96 h, followed by chemical and biomolecular assays. Chemical analysis in the whole scallop soft tissue indicated that the organisms bioaccumulated PHAs in a time- and concentration-dependent manner, where naphthalene, phenanthrene and derivatives were the most expressively bioaccumulated PAHs. The transcript levels of seven phase I and II biotransformation genes were analyzed by RT-qPCR in the gills and digestive gland of the scallops, as well as fifteen other genes associated with cellular functions ranging from energy metabolism to immune function and cellular repair. Gill and digestive gland presented notably upregulation of the following biotransformation genes in at least one of the concentration and exposure periods: cytochrome P450 isoforms *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, glutathione S-transferase omega - *GST_omega-like*, sulfotransferases isoforms *SULT1B1-like* and *SULT4A1-like*, and monoamine oxidase - *MAO-like*. On the other hand, genes associated with immune function (pantetheinase-like - *VNN1-like*, yellow protein-like - *YELL-like*), energy metabolism (phospholipase B1 membrane associate-like - *PLB1-like*, cAMP-responsive element-binding protein-like 2-like - *CREB2-like*, and glycogen-binding subunit 76A-like - *GBS76A-like*), and cellular repair (fibroblast growth factor receptor 2-like - *FGFR2-like*) were upregulated exclusively in the gills, except for *GBS76A-like* that was also upregulated in the digestive gland. Our data suggest that scallops can adopt some strategies to metabolize PAHs present in crude oil, and also trigger a wider variety of cellular responses as possible adaptive mechanisms. The present work points to a set of 21 genes from *N. nodosus* as biomarkers of aquatic contamination to PAHs, and the use of gills and digestive gland as target tissues. These assays could be applied as additional parameters in biomonitoring programs in areas with oil and gas production or contamination, especially offshore ones. This could help to characterize possible PAHs contamination in such areas, and monitor the persistence, fate and effects of these chemical during and after oil spill events.

Keywords: Crude oil; PAHs; bivalves; scallops; biotransformation; cytochrome P450

Introdução

Os derramamentos de petróleo que ocorreram no ambiente marinho em diferentes áreas do globo (por exemplo, a maré negra do navio *Prestige* na Europa Ocidental em 2002, o Explosão da plataforma *Deepwater Horizon* no Golfo do México em 2010 e o derramamento de óleo no Campo de Frade no Brasil, em 2012) são um indicativo claro do potencial risco ambiental causado por hidrocarbonetos de petróleo (Mendes et al, 2014; Milinkovitch et al, 2012). Os HPAs são considerados contaminantes potenciais em zonas estuarinas e *offshore* e aproximadamente 1,3 milhões de toneladas de petróleo e derivados são derramados anualmente no mar (Lari et al., 2016; c. f. NRC, 2003).

Plataformas de petróleo podem gerar grandes volumes de água de produção, aproximadamente 10 vezes o volume total de óleo produzido. O óleo cru e a água de produção são compostos principalmente por hidrocarbonetos alifáticos/aromáticos que, devido suas características lipofílicas, penetram facilmente nas membranas biológicas (via dermal ou rotas respiratórias), além de possuírem potencial carcinogênico e atividade mutagênica (Martins et al., 2013; Noh et al., 2015a). Portanto, a poluição resultante do derramamento de óleo no ambiente aquático tem se tornado uma preocupação mundial por causa dos seus efeitos sobre organismos aquáticos e ecossistemas (Silva et al., 2009). Geralmente, HPAs de alto peso molecular apresentam maior atividade carcinogênica e mutagênica, enquanto os de baixo peso apresentam efeitos agudos tóxicos, são mais solúveis, mais voláteis e mais lipofílicos; conseqüentemente, são mais facilmente bioacumulados nos organismos aquáticos. Alguns HPAs estão incluídos na lista de substâncias prioritárias da *European Water Framework Directive*, *US Environmental Protection Agency* (USEPA) e *World Health Organization* (WHO) (Martins et al., 2015), baseadas em seu perfil toxicológico.

A exposição dos organismos aquáticos aos HPAs pode provocar danos ao DNA e à membrana celular, causar disfunção imune e reduzir a capacidade antioxidante celular (Hannam et al., 2010; Grintzalis et al., 2012; Noh et al., 2015). Além disso, espécies aquáticas são frequentemente expostas não somente a um HPAs individualmente, mas sim à uma mistura complexa de HPAs, que podem causar efeitos agonistas ou antagonistas. A bioacumulação de HPAs pode ser evitada, ou ao menos atenuada, por reações de biotransformação: a fase I consiste em reações catalisadas principalmente pela enzima citocromo P450 (CYPs) que inclui um grupo funcional hidroxila em seu substrato,

e a fase II compreende reações de conjugação catalisadas por enzimas como a glutathiona S-transferases (GSTs) e sulfotransferases (SULTs). Juntas, essas reações asseguram o aumento da hidrosolubilidade e as taxas de excreção dos compostos tóxicos pela fase III (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003; Pessatti et al., 2016), possivelmente prevenindo efeitos adversos causados por essas substâncias. Ao mesmo tempo, as reações de biotransformação podem levar à ativação metabólica dos HPAs e gerar intermediários altamente reativos, como as quinonas e diol-epóxidos, resultando no aumento da produção de EROS (Martins et al., 2015).

Conhecidos como organismos filtradores de notável capacidade bioacumuladora, e também por possuir uma vasta gama de defesas celulares para evitar os efeitos tóxicos dos produtos químicos, os bivalves são comumente utilizados como organismos bioindicadores em estudos de contaminação aquática, especialmente relacionados à HPAs (Hannam et al., 2009; Rocher et al., 2006). Estudos prévios indicaram a correlação existente entre a bioacumulação de HPAs em bivalves e a indução de genes relacionados a biotransformação, como possível resposta adaptativa (Lüchmann et al., 2014; Liu et al., 2015). De fato, muitos estudos têm detectado a inducibilidade de genes relacionados às funções imunes, proteção ao estresse oxidativo, metabolismo de aminoácidos, supressão tumoral e funções celulares complexas em bivalves perante estressores ambientais (Boutet et al., 2005; Tanguy et al., 2005; Dondero et al., 2006; Bado-Nilles et al., 2010; Giuliani et al., 2013).

Estudos não publicados realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram a indução e repressão de genes relacionados à biotransformação, imunidade e várias outras funções fisiológicas em vieiras *Nodipecten nodosus* após a exposição aguda nas proximidades das plataformas de exploração de petróleo *offshore*, no Brasil. Com os recentes planos direcionados ao aumento da produção de óleo no país, estudos são necessários para identificar espécies em potencial e biomarcadores de exposição à HPAs em programas de biomonitoramento, principalmente em áreas *offshore*.

No presente estudo, foi realizada uma exposição aguda em laboratório, onde as vieiras *N. nodosus* foram expostas ao óleo cru, com o intuito de validar um conjunto de genes relacionados à várias funções celulares, possivelmente alterados pela exposição ao óleo cru e que poderiam ser utilizados em programas de biomonitoramento de áreas de produção de óleo e gás.

Materiais e Métodos

Vieiras e condições de exposição

Vieiras *N. nodosus* com comprimento de concha similiar (6,0 – 8,0 cm) foram coletadas em uma zona de cultivo no Ribeirão da Ilha, Florianópolis (SC - Brasil). Após a coleta, os animais foram limpos e transportados para o laboratório, onde foram aclimatados por 5 dias em tanques de fibra de vidro com água filtrada (0,45 µm) (20 °C e 30 salinidade, 5 L por animal) e aeração constante. As vieiras foram alimentadas com fitoplâncton comercial para animais marinhos filtradores (Phyto-Plus B, MICROBE-LIFT, USA) e a água foi completamente renovada a cada 24 h.

O experimento foi conduzido com três grupos de exposição: Controle (Ct, somente água filtrada), exposto a 0,33 g L⁻¹ (E1) e exposto a 0,66 g L⁻¹ de óleo cru (E2), baseado em Milinkovitch et al., (2012). O óleo cru foi gentilmente cedido pela Companhia Nacional de Petróleo, Gás e Energia (Petróleo Brasileiro S.A. — Petrobras), e cada grupo consistiu em 4 aquários de exposição (50L cada). O óleo cru foi adicionado aos aquários nas respectivas concentrações nominais, 24 h antes da exposição ocorrer, e duas pequenas bombas (*wavemakers*) foram instaladas em cada aquário para a homogeneização do óleo na água. Estas bombas continuaram nos aquários para manter a circulação da água até o final do experimento. No início da exposição, as vieiras foram transferidas para os aquários da seguinte forma: para cada grupo (Ct, E1 e E2), 2 aquários foram utilizados para a exposição de 24 h e mais dois para a exposição de 96 h, cada um contendo 10 animais. Não houve renovação de água ou reposição do óleo durante o período de exposição. Após 24 h e 96 h de exposição, 5 vieiras (por aquário) foram coletadas para compor as amostras para análise molecular e outras 5 (por aquário) para compor a análise química dos tecidos (totalizando 10 vieiras por grupo, por tempo de exposição). Brânquia e glândula digestiva foram coletadas para análise molecular e armazenadas a -20 °C em solução de *RNA Later*® Sigma. Para a análise química, o tecido inteiro das vieiras foi coletado e armazenado em embalagem de alumínio em freezer -80 °C. Os animais não foram alimentados durante o período de exposição para prevenir a bioacumulação de HPAs pelo alimento. Nenhuma vieira morreu durante o experimento.

Concentração de HPAs nos tecidos

Para investigar a bioacumulação de HPAs nos tecidos, as amostras de vieiras foram analisadas pelo método de McLeod et al. (1986) com pequenas modificações. Resumidamente, as amostras foram congeladas a seco, homogeneizadas e 1g de cada uma das amostras foi extraída com uma mistura de n-hexano e diclorometano 50 % (v/v) em Soxhlet por 8 horas. Antes da extração foram adicionados d8-naftaleno, d10-acenafteno, d10-fenantreno, d12-chrysene e d12-perileno assim como as amostras e o material de referência padrão (2974a SRM – Tecido orgânico liofilizado de *Mytilus edulis*) do NIST - *National Institute of Standards and Technology* dos EUA. Os hidrocarbonetos extraídos passaram por cromatografia em coluna de sílica gel-alumina e foram analisados quantitativamente por um cromatógrafo de gás, *Agilent 6890*, acoplado a um espectrômetro de massa 5973N (GC/MS) selecionado no modo de íon (SIM). A coluna capilar de filme HP5MS de 25 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura, foi programado de 40 °C a 60 °C, a 20 °C min⁻¹, de 60 °C a 300 °C, a 4 °C min⁻¹ e mantida a 300 °C durante 10 min em GC/MS. Os HPAs foram analisados quantitativamente com base no tempo de retenção do padrão de certificação e razão de massas (m/z) do íon de quantificação.

Seleção dos genes e níveis de transcritos

Os vinte e um genes de interesse seguintes foram selecionados através da base de dados do transcriptoma de *N. nodosus* (manuscrito em preparação): 7 genes estão relacionados com a biotransformação de xenobióticos, como o citocromo P450 - *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, assim como monoamina oxidase - *MAO-like*, glutationa S-transferase - *GST_omega-like* – e sulfotransferase - *SULT1B1-like*, *SULT4A1-like*; além destes, 14 genes estão relacionados à diferentes funções celulares e moleculares: fator *von Willebrand A* - proteína contendo o domínio 7 (*VWA7-like*), função desconhecida; panteteinase (*VNN1-like*), proteína amarela (*YELL-like*), ubiquitina ligase (*TRIM56-like*), transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (*STAT2-like*) – todos relacionados com funções imunes; receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2 (*FGFR2-like*) – reparo celular e fator de crescimento; fosfolipase B1 associada à membrana (*PLB1-like*) – metabolismo de lipídeos; proteína de ligação responsiva ao AMP cíclico (*CREB2-like*), processos de aprendizagem e memória e metabolismo da glicose;

mioglobina (*MYG-like*) – transporte de oxigênio; receptor neural acetilcolina subunidade *alpha-2* (*ACHA2-like*) – transdução de sinal; nucleotidase (*NTD-like*) – metabolismo de nucleotídeos; helicase e endonuclease aneladora de DNA (*ZRAB3-like*) – reparo de DNA; prolil-4-hidroxilase subunidade *alpha-3* (*P4HA3-like*) – resposta à hipóxia; e subunidade de ligação ao glicogênio 76A (*GBS76A-like*) – metabolismo do glicogênio. Estes genes foram escolhidos uma vez que foram detectados com elevados níveis de transcrição em vieiras após a exposição em áreas de exploração de petróleo (*in situ*), em experiências anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). Os iniciadores foram desenhados no *software* *OligoAnalyzer*® e *PrimerQuest*® (IDT, <http://www.idtdna.com>) baseados na sequência completa e/ou parcial do RNA mensageiro (mRNA). A abreviação dos genes, nome, função, sequência dos iniciadores, tamanho do amplicon (pb) e respectivo tecido analisado, são apresentados na tabela 1.

O RNA total foi extraído dos tecidos individualmente (100 mg, n = 10) usando QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante (Qiagen, 2009a). A concentração do RNA e pureza foram analisados em espectrofotômetro NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific). A transcrição reversa foi realizada com o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen 2009b), usando 1 µg do RNA total. A quantificação do DNA complementar (cDNA) de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop® a 260 nm e diluído em água livre de nuclease (Sigma) antes de ser utilizado nas análises. As alíquotas de cDNA diluídas foram armazenadas a -20°C.

As reações de qPCR foram realizadas com 100ng de cDNA por reação com o kit QuantiNova® SYBR® Green PCR kit (Qiagen, 2013) usando um termociclador Real-time cycler Rotor Gene Q Qiagen® e o software Rotor Gene 6000 Series. As condições de amplificação foram definidas como: fase de ativação (95 °C por 2 min), desnaturação (95 °C por 5 s), e anelamento/extensão (60 °C por 10 s). Para todas as reações, 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão foram realizados. As amostras foram verificadas em gel de eletroforese para checar o amplicon e a presença de dímeros. A expressão relativa do mRNA de cada gene foi analisada usando o método $2^{-\Delta Ct}$ e normalizado pela média geométrica de dois genes endógenos de referência: proteína ribossomal *28s-like* (*28s-like*) e *alpha* tubulina-*like* (*ALPHA_TUB-like*) nas amostras de brânquia e fator de alongação *1-like* (*Efl-like*) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase-*like* (*GAPDH-like*) em amostras de glândula digestiva (Hellemans et al., 2007; Schmittgen and Livak, 2008).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados nas análises de qPCR de cada gene alvo e de referência* com a abreviação do gene e função.

Abreviação do nome	Função	Sequência dos iniciadores 5'- 3'
<i>CYP2D20-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - CCACAACAAACCGTCCAAGACAAAC R - CCCATCCGAAGAACCTCCATGATGA
<i>CYP2U1-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - CGATCCGTTCCGTAAACTTTGCCATC R - ACTCTGTCCACACCGATCCTGAAATA
<i>CYP3A11-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - CAAGGAGACAGGTCGCAAGTATT R - TGTGATCTGAGGAACCGTTGCTTTC
<i>MAO-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - TGCTACTGAGCCATCCTGTGTGTAG R - GGAGCGGAAGTGGTGTGCTATTAT
<i>GST_omega-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - CTCTATCTTCTGTGTGCCAATACC R - TCATTCTAAGGGTTCGGAGTTT
<i>SULT1B1-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - GATTGCTGCTGCCATCTAACGAAATC R - AGGAACTGACCATGACTCTGCTTTGT
<i>SULT4A1-like</i>	Biotransformação de xenobióticos	F - CGTACTGGCACATTGAACTATCACG R - TCCCTTACCCTTCTCATCTCTC
<i>VWA7-like</i>	Função desconhecida	F - GCTATGTACTCCACCACCGAATAAC R - ACCTGACCCTGGACAAGAGAAAGT
<i>VNN1-like</i>	Função imune	F - GCTGTTACATTGACACTCCGTTTGG R - GACATTGCGTACACCGTGGTTAGTA
<i>YELL-like</i>	Função imune	F - GGTCCGCCAGGTATAAATGGTATC R - ACGGAAGTGATGCTCGTAGGAATCT
<i>TRIM56-like</i>	Função imune	F - GCATCCGACAGGACTACCAAGAATTA R - TCCTTGACAGACTCCGTATACCTCT
<i>STAT2-like</i>	Função imune	F - CGTCGCCAGGTGACAATGAAACATTC R - GAGGACATTCCATCCGCACCTTGAG
<i>FGFR2-like</i>	Reparo celular e fator de crescimento	F - GTGTGGTCCATGGCATTGTGATGTG R - TGGTGGTCTTCTCTTCTCTCAA
<i>PLB1-like</i>	Metabolismo de lipídios	F - GGTGGTAAACGATCTGTGTACTG R - GCGTGCGAGATTGTTATGAAGGATG
<i>CREB2-like</i>	Processos de aprendizagem e memória, metabolismo da glicose	F - GCAAAGGTTGACGTGAAGGCAAAG R - GCTTGCTCTGCTGCTAACTAAATCT
<i>MYG-like</i>	Transporte de oxigênio	F - CGGAAACACATGCCACTCAAGCATAG R - CAGTCCACGCAACAGCTCTCAA
<i>ACHA2-like</i>	Transdução de sinal	F - ACAAGGCGTTACGATTTCTACCTGAC R - GAAGTACGAAGACGAGGACAATGA
<i>NTD-like</i>	Metabolismo de nucleotídeos	F - AAATCATCGGTCTCGGTCACTATGG R - CCACCACTATCACGTCTAATCCTTC
<i>ZRAB3-like</i>	Reparo de DNA	F - ACAGCGAGAACAGATGGTCAAACAC R - GTTGTCAATGTCACACTCTCTCCAC
<i>P4HA3-like</i>	Relacionado à hipóxia	F - ACCATCAGAGGAGGCTTCAACAACA

		R - CCATCCACAACCTCCCTCAATCATATCC
<i>GBS76A-like</i>	Metabolismo do glicogênio	F - TGCCGTGTGAGATACACCACAATG
		R - CGCAGGTGCCACAATACTGAATGA
<i>28s-like*</i>	Subunidade ribossomal maior do RNA	F - AGTTGTCTCCACCTTCTCATCAATC
		R - CAAGAGTAGCCATGTTGCCAGTCTGA
<i>ALPHA_TUB-like*</i>	Componente estrutural do citoesqueleto	F - AACAGTGAAGAGTTGGGACCGTAG
		R - TAGAAGTGTGGCTCCATTGAGAAA
<i>Ef1-like*</i>	Função na cadeia de alongação durante a síntese de polipeptídeos	F - CAAGGTCAGAGTATTGCCATCAC
		R - CGGTCAACACAGGATAAGGATGTC
<i>GAPDH-like*</i>	Processos glicolíticos	F - CAGATCACCTTCCGATGTTCTTGTAG
		R - TGTTCCCGATGTGTCTGTTGTGACTT

Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro–Wilks) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett), e os *outliers* foram excluídos de acordo com o teste de Grubbs. Quando necessário, os dados foram normalizados usando a transformação logarítmica ($Y = \log(Y)$) (Zar, 1999). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos do teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD).

Resultados

Concentração de HPAs nos tecidos

Os HPAs analisados e seus respectivos valores nos tecidos inteiros das vieiras *N. nodosus* estão apresentados na Tabela 2. Os níveis de HPAs totais em vieiras expostas durante 24 h à concentração nominal de 0.33 (E1) e 0.66 (E2) g L⁻¹ de óleo cru foi de 35.4 e 92.9 vezes maior do que o Ct (0.6 µg g⁻¹ peso seco), respectivamente. Este padrão foi ainda mais expressivo após 96 h onde os níveis de HPAs totais aumentaram 61,9 e 343,5 vezes em E1 e E2 em relação ao Ct (0,4 µg g⁻¹ peso seco), respectivamente. A exposição ao E1 após 24 h e 96 h de exposição causaram a bioacumulação de HPAs principalmente de baixo peso molecular, tais como as formas metiladas e etiladas de naftaleno, assim como fenantreno e suas formas metiladas (correspondente a 68 – 77% do total de HPAs). Os maiores níveis de HPAs detectados em E2 após 24 h e 96 h indicaram um padrão similar: novamente as formas

metiladas e etiladas de naftaleno, e fenantreno e suas formas metiladas foram significativamente maiores, alcançando 85% do valor total de HPAs em ambos os períodos de exposição

Quando comparados ao perfil de HPAs bioacumulado em cada tempo de exposição, foi observado que depois de 24 h os HPAs de 2 ou 3 anéis (mais solúveis em água) foram responsáveis por 90 a 98% do total de HPAs em E1 e E2, respectivamente. Após 96 h, esses valores continuaram expressivos, porém um pouco mais baixos: 83% e 94% em E1 e E2, respectivamente, possivelmente devido ao aumento dos níveis de HPAs com 4-6 anéis (principalmente criseno, pireno e suas formas metiladas) durante a exposição prolongada. Dimetilnaftaleno foi o HPAs que apresentou maior valor após 24 h de exposição (ambos E1 e E2), enquanto após 96 h, o metilnaftaleno (E1) e dimetilnaftaleno (E2) apresentaram os maiores níveis nos tecidos.

Tabela 2 –Níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos tecidos inteiros de vieiras *Nodipecten nodosus* referentes ao controle (Ct) e tratamentos (E1 – 0.33 g L^{-1} e E2 – 0.66 g L^{-1}), após 24 e 96 h de exposição ao óleo cru (n = 1 pool de 10 animais).

HPAs ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	Nº anéis aromáticos	24 h			96 h		
		Ct	E1	E2	Ct	E1	E2
Naftaleno	2	0.082	0.394	0.778	0.064	0.197	0.446
Metilnaftaleno	2	0.015	3.058	6.433	0.041	1.428	6.762
Dimetilnaftaleno	2	0.134	4.393	13.417	0.064	3.787	47.213
Trimetilnaftaleno	2	0.035	1.849	3.629	0.021	2.127	19.715
Etilnaftaleno	2	0.040	0.541	1.354	0.017	0.302	3.112
Bifenil	2	0.029	0.086	0.187	0.020	0.063	0.393
Acenafteno	3	0.009	0.044	0.130	< 0.005	0.032	0.331
Acenaftileno	3	0.004	0.009	0.008	0.009	0.019	0.042
Fluoreno	3	0.040	0.322	0.709	0.018	0.249	1.889
Metilfluoreno	3	0.011	0.125	0.914	< 0.01	0.220	0.262
Dimetilfluoreno	3	0.018	0.607	0.583	< 0.01	2.002	3.349
Metildibenzotiofeno	3	0.017	0.321	0.433	< 0.003	0.889	1.097
Dimetildibenzotiofeno	3	0.010	0.347	0.172	0.017	1.122	1.855
Dibenzotiofeno	3	0.033	0.503	0.669	< 0.001	0.726	2.196
Fenantreno	3	0.044	2.512	3.262	0.059	4.292	10.604

Metilfenantreno	3	0.012	3.346	3.053	0.015	9.556	17.284
Dimetilfenantreno	3	0.030	0.891	0.841	0.029	3.147	9.434
Antraceno	3	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003
Reteno	3	0.014	0.034	0.049	< 0.005	0.045	0.074
Fluoranteno	4	0.007	0.035	0.007	0.011	0.065	0.126
Metil fluoranteno	4	< 0.005	0.168	0.093	< 0.005	0.561	0.478
Benzo(a)antraceno	4	0.006	0.200	0.112	< 0.003	0.069	0.104
Criseno	4	0.009	0.332	0.157	0.008	1.184	1.577
Metilcriseno	4	< 0.007	0.316	0.087	< 0.007	0.997	1.315
Dimetilcriseno	4	< 0.007	0.476	0.145	< 0.007	1.370	1.789
Pireno	4	0.011	0.116	0.090	0.011	0.387	0.643
Metilpireno	4	0.010	0.325	0.153	< 0.005	1.139	1.558
Benzo(a)pireno	5	< 0.002	0.018	0.011	< 0.002	0.031	0.047
Benzo(e)pireno	5	< 0.002	0.065	0.014	< 0.002	0.156	0.220
Benzo(b)fluoranteno	5	< 0.002	0.011	0.004	< 0.002	0.043	0.085
Benzo(j)fluoranteno	5	< 0.002	0.005	0.008	< 0.002	0.008	0.104
Benzo(k) fluoranteno	5	< 0.002	0.004	0.003	< 0.002	0.005	0.071
Perileno	5	< 0.001	0.029	0.006	< 0.002	0.026	< 0.002
Benzo(g,h,i)perileno	6	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	6	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Dibenzo(a,h)antraceno	6	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
HPAs totais		0.605	21.430	37.449	0.390	36.245	133.954

Efeito do óleo cru nos níveis de transcrição de genes

Em relação aos genes de biotransformação de fase I, o conjunto de 3 isoformas de CYP analisados neste estudo apresentaram um padrão de indução em bloco após a exposição ao óleo cru, tanto nas brânquias como na glândula digestiva. Nas brânquias, os níveis de transcritos de *CYP2D20-like* (Fig. 1A) apresentaram um menor aumento em E1 após 24 h (1,5 vezes), *CYP2UI-like* (Fig. 1B) aumentou em E2 (24 h – 2,0 vezes e 96 h – 2,6 vezes), enquanto *CYP3A11-like* (Fig. 1C) apresentou uma resposta robusta, com o aumento de aproximadamente 14 vezes após a exposição a E1 em ambos os tempos, e em E2, 22,0 e 29,5 vezes, respectivamente. Na glândula digestiva, *CYP2UI-like* (Fig. 2A) apresentou um menor aumento dos níveis em E2 após 24 h (1,6 vezes) e em E1 e E2 após 96 h (1,8 e 2,2 vezes, respectivamente), enquanto

CYP3A11-like (Fig. 2B) apresentou um aumento moderado em ambos os grupos após 24 h (E1 – 4,8 vezes, E2 – 6,0 vezes) e um aumento mais elevado após 96 h (E1 – 10,7 vezes, E2 – 24,5 vezes). Além disso, o gene *MAO-like* apresentou baixos níveis de transcritos nas brânquias (Fig. 1D) após 24 h em E1 (0,9 vez) e na glândula digestiva (Fig. 2C) após 24 h de exposição a E2 (1,7 vezes).

Os genes de biotransformação de fase II, tais como *GST_omega-like* em brânquia, aumentaram após 24 h em ambos E1 (3,4 vezes) e E2 (8,0 vezes), e também após 96 h (E1 – 4,5 vezes, E2 – 7,1 vezes) (Fig 1). Este mesmo gene apresentou um aumento nos seus níveis em glândula digestiva (Fig. 2D) após 24 h em E2 (2,5 vezes) e após 96 h em ambos E1 (2,6 vezes) e E2 (5,6 vezes). Respostas similares foram observadas nos níveis de transcritos da *SULT1B1-like* em brânquias (aumento de 4,5 e 15 vezes após 24 h em E1 e E2; aumento de 22 e 23 vezes após 96 h em E1 e E2, e em glândula digestiva (aumento de 2,8 e 3,9 vezes após 24 h em E1 e E2; aumento de 5,1 e 7,9 vezes após 96 h em E1 e E2) (Figs. 1F e 2E). Os níveis de transcritos de *SULT4A1-like* permaneceram inalterados em brânquia após a exposição ao óleo cru, porém apresentaram um aumento de 12,4 vezes na glândula digestiva (Fig. 2F) em E2 após 96 h.

Aumentos na transcrição de genes envolvidos em diferentes funções celulares e moleculares também foram analisados na glândula digestiva e brânquias. A maioria destes foi modulada apenas nas brânquias, particularmente após 24 h. Em relação a este tecido e tempo de exposição, os níveis de mRNA do gene *VNN1-like* (Fig. 3A) foram maiores após exposição a E2 (2,0 vezes); *YELL-like* (Fig. 3B) e *VWA7-like* (Fig. 3C) aumentaram em E1 (49,9 e 2,2 vezes, respectivamente); e *FGFR2-like* (Fig. 3D) aumentaram em ambos E1 (1,6 vezes) e E2 (1,4 vezes). Os genes *PLB1-like* (Fig. 3E) e *CREB2-like* (Fig. 3F) foram significativamente responsáveis ao óleo cru nas brânquias, com aumento nos níveis após exposição a ambos os grupos e períodos (1,5 – 4,8 vezes). O gene *GBS76A-like* foi o único que apresentou aumento na regulação dos níveis de transcritos em brânquia e glândula digestiva (Figs. 3G e H): no primeiro tecido apresentou aumento em E1 após 24 h (1,8 vezes) e em E2 após 96 h (1,6 vezes) enquanto na glândula digestiva apresentou aumento em E1 após 24 h (3,1 vezes) e 96 h (6,2 vezes). Os genes *SULT4A1-like*, *MYG-like*, *STAT2-like*, *TRI56-like*, *ACHA2-like*, *NTD-like*, *P4AH3-like* e *ZRAB3-like* não apresentaram diferenças significativas nas brânquias, assim como os genes *MYG-like*, *VNN1-like*, *PLB1-like*, *STAT2-like* e *TRI56-like*, não apresentaram diferenças na glândula digestiva.

Fig. 1 - Níveis normalizados da transcrição de genes de biotransformação, A – *CYP2D20-like*, B – *CYP2U1-like*, C – *CYP3A11-like*, D – *MAO-like*, E – *GST_omega-like* e F – *SULT1B1-like* em brânquia de vieiras *N. nodosus* expostas ao óleo cru por 24 e 96 h. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – E1 (0.33 g L⁻¹) e E2 (0.66 g L⁻¹) – em relação ao controle (Ct). Para cada tempo de exposição (24 h e 96 h), grupos não compartilhando letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$), n=10 animais por grupo.

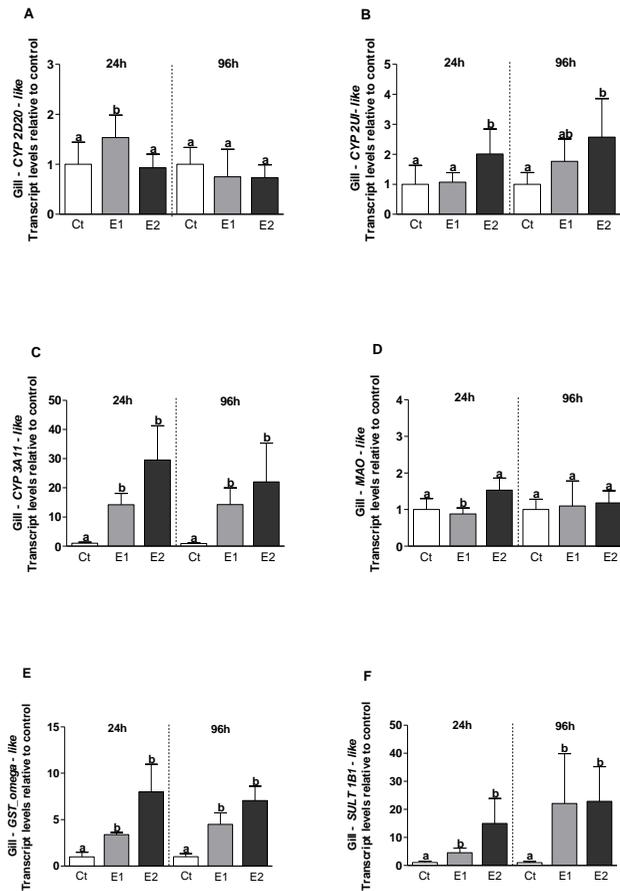


Fig. 2 - Níveis normalizados da transcrição de genes de biotransformação A – *CYP2U1-like*, B – *CYP3A11-like*, C – *MAO-like*, D – *GST_omega-like*, E – *SULT1B1-like* e F – *SULT4A1-like* em glândula digestiva de vieiras *N. nodosus* expostas ao óleo cru por 24 e 96 h. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – E1 (0.33 g L⁻¹) e E2 (0.66 g L⁻¹) – em relação ao controle (Ct). Para cada tempo de exposição (24 h e 96 h), grupos não compartilhando letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$), $n = 10$ animais por grupo.

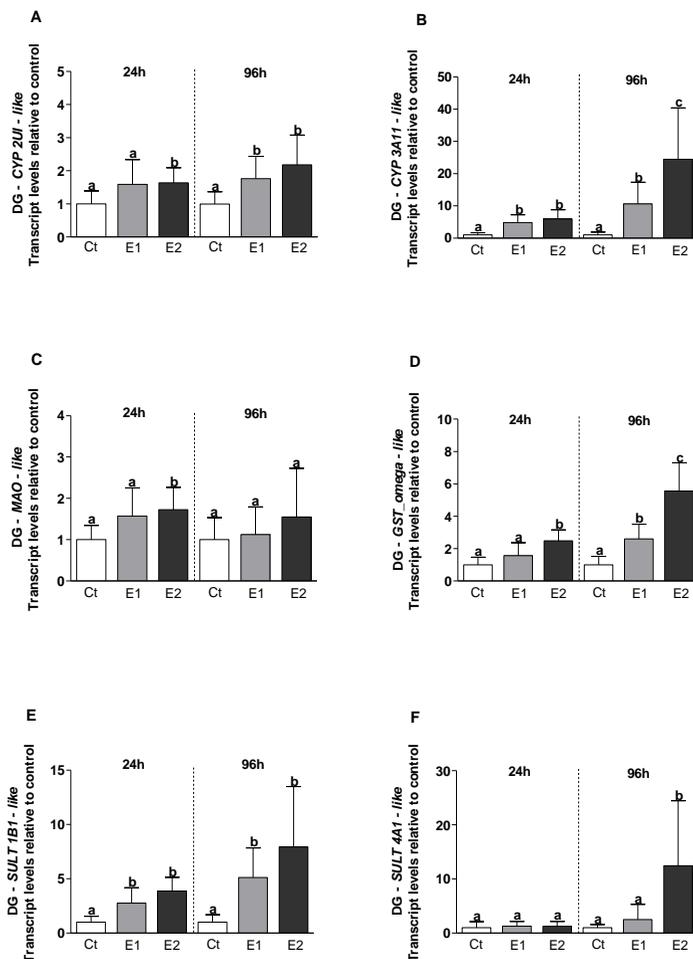
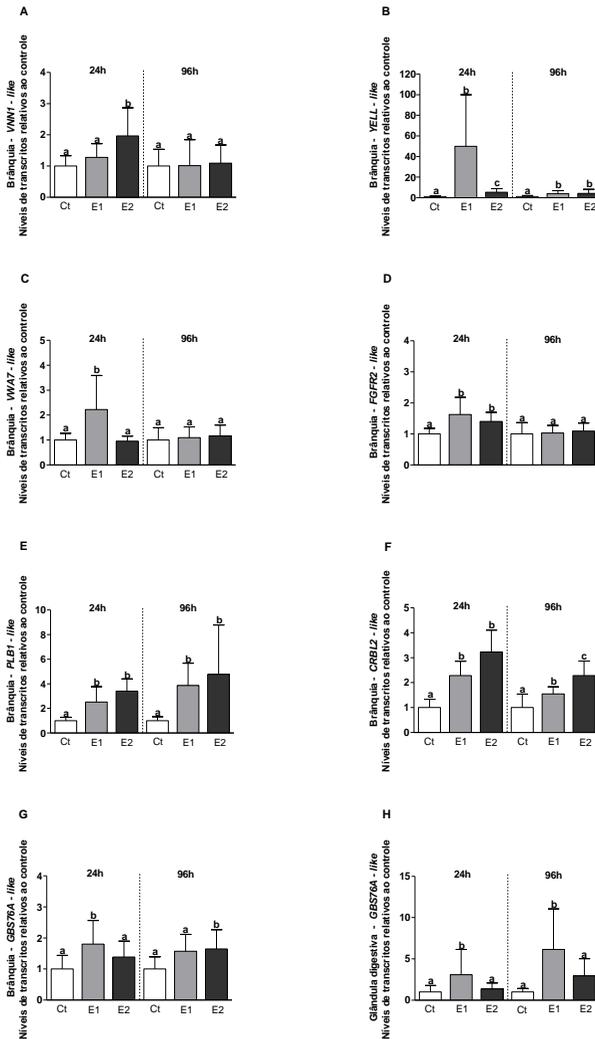


Fig. 3 - Níveis normalizados da transcrição de genes relativos a diferentes funções celulares: A – *VNN1-like*, B – *YELL-like*, C – *VWA7-like*, D – *FGFR2-like*, E – *PLB1-like*, F – *CREB2-like* e G – *GBS76A-like* em brânquia e H – *GBS76A-like* em glândula digestiva de vieiras *N. nodosus* expostas ao óleo cru por 24 e 96h. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e os dados expressos como indução (vezes) relativa à exposição aos tratamentos – E1 (0.33 g L⁻¹) e E2 (0.66 g L⁻¹) – em relação ao controle (Ct). Para cada tempo de exposição (24 h e 96 h), grupos não compartilhando letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$), $n = 10$ animais por grupo.



Discussão

Este estudo investigou a resposta molecular de vieiras *N. nodosus* após uma exposição de curta duração em laboratório a uma mistura complexa de HPAs, como o óleo cru. Vieiras são comumente utilizadas como organismos sentinela na avaliação da contaminação por HPAs pois possuem movimentação lenta, capacidade reduzida para escapar de uma fonte pontual de contaminação e maior capacidade de bioacumulação de xenobióticos em seus tecidos (Hannam et al., 2010b; Jin et al., 2014; André Lourenço et al., 2015; Frantzen et al., 2016). O presente experimento foi conduzido para avaliar um conjunto de genes possíveis biomarcadores de exposição a HPAs em vieiras. Nossos dados indicam que *N. nodosus* possuem respostas e estratégias moleculares que estão possivelmente envolvidas na adaptação à exposição aos HPAs, e poderiam ser utilizados como biomarcadores moleculares em vieiras transplantadas para áreas *offshore* com operações de petróleo e gás, onde a exposição à HPAs ocorre comumente devido aos resíduos de perfuração, a liberação de água produzida e eventos de derramamentos de óleo.

As vieiras *N. nodosus* bioacumularam HPAs em tempo e concentração dependentes, similarmente observado em ostras *Crassostrea brasiliana* expostas ao fenantreno (Lüchmann et al., 2014). Aumento nos níveis de HPAs foram descritos em muitos bivalves como *Perna viridis* (Cheung et al., 2001) e *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti et al., 2008), *Ruditapes philippinarum* (Liu et al., 2014), *Chlamys farreri* (Xiu et al., 2015) e *N. nodosus* (Piazza et al., 2016) expostas a HPAs em laboratório ou no ambiente natural. No presente estudo, a bioacumulação de HPAs nas vieiras após a exposição ao óleo cru foi marcada pelo aumento dos níveis de HPAs nos tecidos, principalmente naftaleno, fenantreno e derivados. O naftaleno e o fenantreno são HPAs compostos por 2 e 3 anéis aromáticos, respectivamente, e são os mais abundantemente encontrados nos ambientes aquáticos contaminados por óleo cru. Além do mais, quando comparados aos HPAs de alto peso molecular, são mais solúveis em água e mais facilmente absorvidos pelos organismos aquáticos (Neff, 2002; Lüchmann et al., 2011), facilitando sua bioacumulação. É importante evidenciar a bioacumulação de HPAs de 4-5 anéis em vieiras após 96 h de exposição ao óleo cru. Mesmo admitindo que os valores bioacumulados não são tão expressivos quanto aos HPAs de 2-3 anéis, os HPAs de alto peso molecular são consideravelmente mais tóxicos e com significativas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Martins

et al., 2015), e, portanto, a bioacumulação detectada no caso de exposição mais prolongada poderia ser uma ameaça para bivalves durante e após os eventos de derramamento de óleo cru. Em nosso estudo, vinte e um genes foram analisados nas brânquias e treze genes na glândula digestiva. Sete deles fazem parte da fase I e II das vias de biotransformação e apresentaram níveis aumentados de transcrição em um ou ambos tecidos após a exposição ao óleo cru: *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like*, *CYP3A11-like*, *MAO-like*, *GST_omega-like*, *SULT1B1-like* e *SULT4A1-like*. Com base nesta lista, *SULT4A1-like* foi responsivo somente em um tecido (glândula digestiva), e *MAO-like* apresentou aumento dos seus níveis de transcritos em glândula digestiva, enquanto na brânquia, apresentou redução. Os genes da família CYP apresentaram uma evidente resposta de ativação em ambos os tecidos (exceto *CYP2D20-like*, que foi analisado somente em brânquia, porém também com aumento dos seus níveis após a exposição). Portanto, foi detectada uma resposta clara da regulação positiva dos níveis de transcritos dos genes participantes em ambas fases I e II das vias de biotransformação na brânquia e glândula digestiva, tecidos relacionados com a absorção, metabolismo e excreção de contaminantes orgânicos. Alternativamente, os genes relacionados a outras vias celulares, tais como função imune, metabolismo energético e reparação celular apresentaram diferenças principalmente nas brânquias.

No ambiente, as substâncias lipofílicas tais como os HPAs tendem a ser absorvidos pelas espécies aquáticas através do sedimento ou de alimentos via órgãos digestivos (tais como a glândula digestiva em bivalves), enquanto que os compostos hidrofílicos podem facilmente alcançar as brânquias (e outros tecidos que tenham elevado contato com o meio circundante), para posterior absorção (Nikinmaa, 2014). No sistema fechado de exposição usado no presente delineamento experimental, os HPAs puderam atingir rapidamente as brânquias dos organismos, provocando respostas adaptativas iniciais de biotransformação possivelmente através dos fatores de transcrição, como o receptor para aril hidrocarboneto (AhR). Este tipo de resposta já foi detectado em vieiras (Cai et al., 2016), assim como pela ativação da via do fator de transcrição NF-E2 p45 (Nrf2), demonstrado em *zebrafish* (Timme-Laragy et al., 2009). Outras vias de sinalização também podem ter sido ativadas inicialmente em brânquias após a exposição aos HPAs, levando à transcrição de diferentes genes conforme detectado neste estudo. Em estudos anteriores, as brânquias de ostras expostas ao fenantreno, substâncias eletrofílicas ou nanomateriais, foram consideradas o primeiro tecido a ser atingido, quando comparado à

glândula digestiva (Lüchmann et al., 2014, Trevisan et al., 2014, 2016). A bioacumulação de HPAs no presente trabalho foi investigada no organismo inteiro, portanto, não podemos afirmar em qual tecido a taxa de bioacumulação foi maior e mais rápida.

As subfamílias CYP2 e CYP3 são conhecidas por desempenhar um importante papel na detoxificação de HPAs, por metabolizar uma série de substratos como os xenobióticos, ácidos biliares, hormônios sexuais e prevenir a bioacumulação de substâncias lipofílicas (Goldstone et al., 2010; Tian et al., 2014). *CYP2D20-like*, *CYP2UI-like* e *CYP3A11-like* demonstraram um aumento nos níveis de transcritos após a exposição ao óleo cru, o que pode estar relacionado a ativação da fase I de biotransformação, como um esforço do organismo para manter a homeostase celular e combater os metabólitos formados durante a exposição aos HPAs. Este mesmo conjunto de genes também apresentou uma ativação em brânquias de vieiras *N. nodosus* expostas ao fenantreno após 24 e 96 h (Piazza et al., 2016), enquanto a transcrição de outras isoformas de CYP também foram detectadas em vieiras expostas em laboratório a um único HPA separadamente (Xiu et al., 2015; Deng et al., 2014). De fato, a informação encontrada na literatura sobre o aumento da transcrição de isoformas de CYP em vieiras durante a exposição a HPAs é escassa, e nossos dados sugerem 3 isoformas provenientes de duas diferentes famílias de CYP, responsivas ao óleo cru e HPAs, com atenção especial ao *CYP3A11-like* que apresentou o maior aumento dos níveis de transcritos.

Outro gene de fase I de biotransformação analisado foi o *MAO-like*, uma enzima mitocondrial que cataliza a desaminação de monoaminas, incluindo a serotonina e catecolaminas, levando à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia, atuando nas respostas imunes dos bivalves (Zhou et al., 2011a). *MAO-like* foi analisado em *Crassostrea gigas* e seus níveis de transcrição foram claramente alterados pela exposição a pesticidas e hidrocarbonetos, e caracterizado pela indução em glândula digestiva e inibição nas brânquias (Boutet et al., 2004a), similarmente ao nosso estudo. Em vieiras *Chlamys farreri*, a indução de *MAO* foi verificada em glândula digestiva, brânquia e outros tecidos após desafiados com *Vibrio anguillarum*, sugerindo que esta enzima esteja relacionada à várias funções fisiológicas, atuando na modulação do sistema imune (Zhou et al., 2011a).

Sequencialmente à fase I, os xenobióticos podem ser metabolizados pelas enzimas de biotransformação de fase II, como as GSTs (Lacroix et al., 2014) e SULTs (Glatt et al., 2001), que são

responsáveis por aumentar a hidrofiliidade dos metabólitos da fase I e outras substâncias eletrofílicas acelerando as taxas de excreção (Michio e Hiroshi, 1994). As GSTs são uma das mais importantes enzimas que catalizam a detoxificação de epóxidos e outras formas intermediárias de HPAs, em um processo que ocorre através da conjugação com a glutathione (Dickinson and Forman, 2002; Pushparajah et al., 2008). Lüchmann et al., (2014), observaram um aumento nos níveis do gene *GST_omega-like* e uma redução nos níveis de glutathione em brânquias de *C. brasiliensis* expostas ao fenantreno, possivelmente relacionado à biotransformação de HPAs. Da mesma forma, Piazza et al., (2016) verificaram um aumento nos níveis de *GST_omega-like* nas brânquias de vieiras após a exposição ao fenantreno. No presente estudo, este gene também apresentou aumento nos níveis de transcrição após 24 e 96 h em ambas concentrações de óleo cru e tecidos. De fato, o gene *GST_omega-like* se apresenta como potencial biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos por ser identificado como gene regulado positivamente após a exposição a vários químicos estressores, como os hidrocarbonetos (Boutet et al., 2004b; Lüchmann et al., 2014; Piazza et al., 2016), esgoto sanitário (Medeiros et al., 2008), poluição urbana (Châtel et al., 2015) e substâncias eletrofílicas (Trevisan et al., 2016).

A sulfatação, mediada pela *SULT* é também uma importante via de metabolização de várias drogas, xenobióticos, neurotransmissores e hormônios (Raftogianis et al., 1999), envolvendo a transferência do grupo sulfonato do doador universal sulfuril, 3-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, para a hidroxila ou grupo amina do substrato (Xi et al., 2016). *SULT1B1-like* apresentou aumento dos seus níveis após a exposição ao óleo cru, como resultado já detectado em outros bivalves após a exposição ao benzo[a]pireno (Liu et al., 2014; Milan et al., 2013; Tian et al., 2013) e fenantreno (Piazza et al., 2016). Em conjunto, os dados relacionados com a fase I e fase II de biotransformação sugerem que as brânquias e glândula digestiva apresentaram uma resposta coordenada de amplificação em vieiras durante a exposição aos HPAs.

Outros genes relacionados a diferentes funções celulares foram regulados positivamente após a exposição do óleo cru, principalmente nas brânquias. Dois deles estavam relacionados à função imunológica: *VNN1-like* e *YELL-like*. *VNN1* é uma enzima que hidroliza a pantetina, um metabólito intermediário da coenzima A, em ácido pantotênico (vitamina B5) e cisteamina. Possui um importante papel na função imune, inflamação e regulação do estresse oxidativo em mamíferos (Maras et al., 1999; Nitto et al., 2008). Não há estudos relacionando o gene *VNN1* com bivalves até o presente momento, no entanto,

sugerimos que *VNNI-like* pode estar relacionado ao estresse oxidativo e funções imunes em vieiras *N. nodosus*. De fato, o metabolismo de HPAs é conhecido por produzir EROS e provocar uma série de reações indesejadas nos organismos, culminando na redução da imunidade e fadiga dos órgãos (Hannam et al., 2010a; Regoli e Giuliani, 2013). Além disso, o aumento dos níveis de *VNNI-like* pode ser caracterizado como um mecanismo compensatório.

YELL-like ou enzima de conversão de dopacromo, foi relacionado às funções imunes, via de biossíntese de melanina e aceleração de reações de pigmentação em insetos (Noh et al., 2015b). Johnson et al., (2001) reportou este gene em mosquito *Aedes aegypti* por desempenhar um importante papel fisiológico, pois é fundamental para a melanização do exoesqueleto e sobrevivência. Não há estudos deste gene em moluscos, mas um intermediário da biossíntese da melanina, chamado L-DOPA descarboxilase, foi caracterizado por modular as respostas imunes em vieiras *Chlamys farreri*, como o encapsulamento de hemócitos e auxiliar na regulação dos níveis de EROS (Zhou et al., 2011b). O sistema PO (fenoloxidase), responsável pela síntese de melanina em moluscos, foi identificado em hemócitos de *N. subnodosus*, sugerindo a participação no sistema de defesa (Luna-González et al., 2003). Além disso, o sistema PO é conhecido por desempenhar um importante papel no crescimento e reparo das conchas de bivalves (Luna-González et al., 2003). Além disso, tanto *VNNI-like* quanto *YELL-like* são proteínas ancoradas na superfície transmembranar (Pitari et al., 2000; Noh et al., 2015b) e sua modulação transcricional pode estar relacionada com as interações HPAs-membrana lipídica, esperadas em eventos de peroxidação lipídica durante a exposição ao óleo cru.

Este cenário de alterações induzidas por HPAs nas membranas lipídicas pode ser discutido levando em consideração o aumento da transcrição de *PLBI-like*. Fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolizar uma ou mais ligações de ésteres em glicerofosfolípídeos, incluindo a fosfolipase A, B e C (Shen et al., 2004; Köhler et al., 2006; Zarai et al., 2011). Estas enzimas mediam vários processos biológicos, tais como o metabolismo de membrana de fosfolípídeos, a digestão de lipídeos na dieta, apoptose, organização do citoesqueleto, transdução de sinal e respostas inflamatórias (Cherif et al., 2010; Zarai et al., 2011; Jiang et al., 2012). A bioacumulação de HPAs pode levar a interações na membrana celular com potencial para provocar stress e perda ou redução da capacidade de homeostase, além de induzir uma série de respostas em níveis moleculares, celulares e

teciduais (Viarengo and Nicotera, 1991; Panfoli et al., 2000; Oliva et al., 2010). Zarai et al., (2011) relataram dois casos da relação entre hepatopancreatite intracelular e fosfolipase A extracelular em moluscos gastrópodes, e Panfoli et al. (2000) relataram a inibição da atividade da fosfolipase C em mexilhão após a exposição à metais. Dheilly et al. (2011) identificaram o gene *PLB1* em glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*, no entanto, o presente estudo é o primeiro a associar as respostas deste gene à exposição a HPAs. Além do mais, a indução de *PLB1-like* pode ser uma resposta adaptativa aos níveis de HPAs e estar relacionado ao metabolismo de fosfolipídeos e estabilidade da membrana celular.

No presente estudo, níveis de transcritos dos genes *FGFR2-like* e *VW7-like* foram regulados positivamente nas brânquias após a exposição ao óleo cru. O primeiro gene é conhecido por ser um receptor que se liga ao fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que são proteínas que regulam a migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade de diferentes tipos de células, incluindo as células tumorais, sendo um fator importante na angiogênese (formação de novos vasos) em tumores malignos e tecidos normais (Presta et al., 2005). Steiling et al. (2003) descreveu o importante papel do gene de *FGFR* no reparo do fígado de ratos após injúria, e Böhm et al. (2010) também mostraram o papel citoprotetor de *FGFR2* na regeneração de fígado de rato. FGFs e seus receptores (FGFRs) não foram relatados em moluscos e suas funções ainda necessitam ser investigadas. Sugerimos a associação deste gene na prevenção de injúrias celulares e perda da homeostase causada durante a exposição aos HPAs. Da mesma forma, *VWA7-like* faz parte de uma superfamília de proteínas contendo o fator *Von Willebrand* tipo A (VWA). A função deste gene não é conhecida, mas o domínio VWA pode ser encontrado principalmente em proteínas extracelulares relacionadas com a adesão celular e em menor grau, com proteínas intracelulares envolvidas na transcrição, reparo de DNA, transporte ribossomal e membranas, proteossomas e principalmente interações proteína-proteína (Tuckwell, 1999, Whittaker e Hynes, 2002). Em nosso estudo, foi verificado o aumento dos níveis de mRNA do gene *VWA7-like* em brânquias de vieiras após a exposição ao óleo cru, o que pode estar associado às interações proteína-proteína durante a exposição aos HPAs.

Essa ativação e desativação de vias celulares, levando a diferentes respostas, são normalmente associadas a uma maior demanda de energia. Neste estudo, detectamos níveis elevados de transcritos do gene *GBS76A-like*, um dos tipos de proteínas reguladas pela proteína

fosfatase 1 (PP1). PP1 é uma classe de proteínas essenciais para o metabolismo do glicogênio, ativando sua degradação de acordo com a demanda de energia celular do organismo (Aggen et al., 2000). Na mosca da fruta, por exemplo, *GBS76A* interage com todas as isoformas de PP1, juntamente com *GBS70E*, que foi identificado pelo *Gene Ontology (GO)* como possível participante na regulação da biossíntese de glicogênio (Bennet et al., 2006). Como já foi demonstrado em abordagens metabolômicas com bivalves, a exposição aos HPAs leva à redução da glicose e glicogênio e uma transição ao metabolismo anaeróbico (Zhang et al., 2011). Assim, é possível que a regulação positiva de *GBS76A*, como detectado no presente estudo, esteja associada ao consumo de glicogênio mais elevado, devido ao aumento repentino no consumo de energia durante a exposição e biotransformação de HPAs. Este cenário de consumo de glicogênio e glicose pode estar associado ao gene *CREB2-like*. CRBL ou CREB é um fator de transcrição induzido pela ativação da cinase e é conhecido principalmente por regularizar as vias de sinalização de memória de curto e longo prazo de moluscos a mamíferos (Frank and Greenberg, 1994). Ao mesmo tempo, esta ativação pode levar à transcrição de inúmeros genes relacionados ao crescimento celular, sobrevivência e memória (Zhu and Wu, 2008), assim como à gliconeogênese hepática (Rui, 2014). CREB2 é um repressor, o que significa que a sua ativação poderia bloquear muitas respostas celulares, incluindo a síntese da glicose. Em moluscos, a via de sinalização CREB e o papel da CREB2 ainda são desconhecidos. Ribeiro et al. (2003) demonstraram CREB1 no sistema nervoso de gastrópodes e o seu papel na plasticidade neuronal e de aprendizagem, e Zhu e Wu (2008) verificaram a transcrição de um homólogo de CREB (Ca-CREB) em ostras *Crassostrea ariakensis*, constitutivamente expresso em tecidos não relacionados com a memória de longo prazo, tais como brânquias, hemócitos, manto, músculo adutor posterior e glândula digestiva, e foi associado às respostas imunes. Em nosso estudo, os níveis de transcritos de *CREB2-like* aumentaram em ambas condições de tempo e tratamento, em brânquias, um tecido não relacionado à memória e aprendizagem. Como a indução indica um possível efeito inibitório na via de sinalização de CREB, este fato poderia estar associado à redução do crescimento celular e sobrevivência, e possível modulação das respostas imunes e desativação da gliconeogênese.

Em conclusão, os dados sugerem que as vieiras podem adotar algumas estratégias para metabolizar os HPAs presentes no óleo bruto. A análise da transcrição de genes pode ajudar a identificar potenciais

mecanismos de desintoxicação e respostas celulares em bivalves durante a exposição a substâncias químicas. O óleo cru causou uma rápida (24 h) e ampla ativação de genes de biotransformação de fase I e II em ambos tecidos, brânquias e glândula digestiva das vieiras. Também causou um aumento na abundância da transcrição de genes associados à função imune, metabolismo de lipídios, glicose, metabolismo do glicogênio e reparo celular. O presente trabalho mostra um conjunto de genes em vieiras *N. nodosus* que podem ser possivelmente utilizados como biomarcadores de contaminação aquática em estudos de biomonitoramento em regiões com atividade petrolífera. Mesmo assim, apesar de contribuir para a compreensão das vias metabólicas não bem estabelecidas em moluscos bivalves, mais estudos são necessários para elucidar tais eventos nestes organismos.

Referências

- Aggen, J.B., Nairn, A.C., Chamberlin, R., 2000. Regulation of protein phosphatase 1. **Chem. Biol.** 7, R13-R23.
- Almeida, E.A.; Bainy, A.C.D.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P., 2003. Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*. **Marine Pollution Bulletin**, v 46, issue 11, p. 1485–1490.
- André Lourenço, R., Francisco de Oliveira, F., Haddad Nudi, A., Rebello Wagener, Â. de L., Guadalupe Meniconi, M. de F., Francioni, E., 2015. PAH assessment in the main Brazilian offshore oil and gas production area using semi-permeable membrane devices (SPMD) and transplanted bivalves. **Cont. Shelf Res.** 101, 109–116. doi:10.1016/j.csr.2015.04.010
- ANP,2014. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis. [National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels.] **Technical Report**. (<http://www.anp.gov.br>) (accessed 16.06.16).
- Bado-Nilles, A., Renault, T., Faury, N., Le Floch, S., Quentel, C., Auffret, M., Thomas-Guyon, H., 2010. In vivo effects of LCO soluble fraction on immune-related functions and gene transcription in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquat. Toxicol.** 97, 196–203. doi:10.1016/j.aquatox.2009.08.005
- Bennett, D., Lyulcheva, E., Alphey, L., Hawcroft, G., 2006. Towards a

- comprehensive analysis of the protein phosphatase 1 interactome in *Drosophila*. **J. Mol. Biol.** 24, 196-212. Doi: 10.1016/j.jmb.2006.08.094
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F., 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquat. Toxicol.** 89, 257–66. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.011
- Böhm, F., Speicher, T., Hellerbrand, C., Dickson, C., Partanen, J.M., Ornitz, D.M., Werner, S., 2010. FGF Receptors 1 and 2 Control Chemically Induced Injury and Compound Detoxification in Regenerating Livers of Mice. **Gastroenterology** 139, 1385–1396.e8. doi:10.1053/j.gastro.2010.06.069
- Boutet, I., Meistertzheim, A.-L., Tanguy, A., Thébault, M.-T., Moraga, D., 2005. Molecular characterization and expression of the gene encoding aspartate aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to environmental stressors. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 140, 69–78. doi:10.1016/j.cca.2005.01.001
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Biochim. Biophys. Acta** 1679, 29–36. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.04.001
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene** 329, 147–57. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027
- Cai, Y., Pan, L., Miao, J., 2016. Molecular evidence for the existence of an aryl hydrocarbon receptor pathway in scallops *Chlamys farreri*. **Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.** 196-187, 74-84. doi: 10.1016/j.cbpb.2016.02.006
- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Gourlay-Francé, C., Pfohl-Leskowicz, A., Vincent-Hubert, F., 2015. Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 114, 241–249. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.023
- Cherif, S., Ben Bacha, A., Ben Ali, Y., Horchani, H., Rekek, W.,

Gargouri, Y., 2010. Crab digestive phospholipase: a new invertebrate member. **Bioresour. Technol.** 101, 366–71. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.031

Cheung, C.C., Zheng, G., Li, A.M., Richardson, B., Lam, P.K., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquat. Toxicol.** 52, 189–203. doi:10.1016/S0166-445X(00)00145-4

Cruvinel, W. de M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Souza, A.W.S. de, Silva, N.P. da, Andrade, L.E.C., n.d. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev. Bras. Reumatol.** 50, 434–447. doi:10.1590/S0482-50042010000400008

Deng, X., Pan, L., Miao, J., Cai, Y., Hu, F., 2014. Digital gene expression analysis of reproductive toxicity of benzo[a]pyrene in male scallop *Chlamys farreri*. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** 110, 190–196. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.002.

Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Favrel, P., 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. **BMC Genomics** 12, 1–17. doi:10.1186/1471-2164-12-468

Doherty, M.J., Cadefau, J., Stalmans, W., Bollen, M., Cohen, P.T., 1998. Loss of the hepatic glycogen-binding subunit (GL) of protein phosphatase 1 underlies deficient glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic rats and in adrenalectomized starved rats. **Biochem. J.** 333, 253–257.

Dondero, F., Piacentini, L., Marsano, F., Rebelo, M., Vergani, L., Venier, P., Viarengo, A., 2006. Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. **Gene** 376, 24–36. doi:10.1016/j.gene.2006.02.015

Frank, D.A., Greenberg, M.E., 1994. CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals. **Cell** 79, 5–8. doi:10.1016/0092-8674(94)90394-8

Frantzen, M., Regoli, F., Ambrose, W.G., Nahrgang, J., Geraudie, P., Benedetti, M., Locke V, W.L., Camus, L., 2016. Biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 127, 95–107.

doi:10.1016/j.ecoenv.2016.01.011

Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., Regoli, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. **Aquat. Toxicol.** 134-135, 120–7. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.012

Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C.E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., Meinl, W., 2001. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. **Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.** 482, 27–40. doi:10.1016/S0027-5107(01)00207-X

Goldstone, J., McArthur, A., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jonsson, M., Nelson, D., Stegeman, J., 2010. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. **BMC Genomics** 11, 643.

Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Dailianis, S., 2012. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. **Mar. Environ. Res.** 81, 26–34. doi:10.1016/j.marenvres.2012.08.004

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., Jones, M.B., 2010a. Functional immune response in *Pecten maximus*: combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. **Fish Shellfish Immunol.** 28, 249–52. doi:10.1016/j.fsi.2009.10.018

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Moody, A.J., Galloway, T.S., Jones, M.B., 2010b. Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: effects of acute oil exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, 1440–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.06.012

Hannam, M.L., Bamber, S.D., Moody, J.A., Galloway, T.S., Jones, M.B., 2009. Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. **Aquat. Toxicol.** 92, 187–94. doi:10.1016/j.aquatox.2009.01.010

Jia, X., Zhang, Z., Wang, G., Zou, Z., Wang, S., Huang, B., Wang, Y., 2009. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of genes related to Tributyltin (TBT) exposure in the abalone *Haliotis diversicolor* supertexta. **Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics** 4, 255–62. doi:10.1016/j.cbd.2009.06.002

- Jiang, F., Huang, S., Imadad, K., Li, C., 2012. Cloning and expression of a gene with phospholipase B activity from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*. **Bioresour. Technol.** 104, 518–22. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.112
- Jin, Q., Pan, L., Liu, D., Hu, F., Xiu, M., 2014. Assessing PAHs pollution in Qingdao coastal area (China) by the combination of chemical and biochemical responses in scallops, *Chlamys farreri*. **Mar. Pollut. Bull.** 89, 473–80. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.09.026
- Johnson, J., Li, J., Christensen, B., 2001. Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 31, 1125–1135. doi:10.1016/S0965-1748(01)00072-8
- Kaskow, B.J., Proffitt, J.M., Michael Proffit, J., Blangero, J., Moses, E.K., Abraham, L.J., 2012. Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - the Vanin pantetheinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 417, 653–8. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.099
- Köhler, G.A., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., Nigam, S., 2006. Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. **Biochim. Biophys. Acta** 1761, 1391–9. doi:10.1016/j.bbali.2006.09.011
- Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., Moraga, D., 2014. A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. **Mar. Pollut. Bull.** 86, 304–13. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.049
- Lari, E., Abtahi, B., Hashtroudi, M.S., 2016. The effect of the water soluble fraction of crude oil on survival, physiology and behaviour of Caspian roach, *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870). **Aquat. Toxicol.** 170, 330–4. doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.003
- Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y., Miao, J., 2014. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 107, 251–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.024
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y., 2015. A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 118, 47–54. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.012

- Livingstone, D., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.** 120, 43–49. doi:10.1016/S1095-6433(98)10008-9
- Lüchmann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan, R., Craft, J.A., Meng, X., Luna-González, A.; Maeda-Martínez, A. N.; Vargas-Albores, F.; Ascencio-Valle, F.; Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology** 15, 275–282
- Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C., Bainy, A.C.D., 2014. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquat. Toxicol.** 152, 324–34. doi:10.1016/j.aquatox.2014.04.021
- Lüchmann, K.H., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Daura-Jorge, F.G., Bainy, A.C.D., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquat. Toxicol.** 105, 652–660. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.003
- Maras, B., Barra, D., Duprè, S., Pitari, G., 1999. Is pantetheinase the actual identity of mouse and human vanin-1 proteins? **FEBS Lett.** 461, 149–152. doi:10.1016/S0014-5793(99)01439-8
- Martins, M., Costa, P.M., Ferreira, A.M., Costa, M.H., 2013. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. **Aquat. Toxicol.** 142–143, 85–95. doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.019
- Martins, M., Santos, J.M., Diniz, M.S., Ferreira, A.M., Costa, M.H., Costa, P.M., 2015. Effects of carcinogenic versus non-carcinogenic AHR-active PAHs and their mixtures: lessons from ecological relevance. **Environ. Res.** 138, 101–11. doi:10.1016/j.envres.2015.02.010
- Medeiros, I.D., Siebert, M.N., de Toledo e Silva, G., Moraes, M.O., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2008. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Mar. Environ. Res.** 66, 156–7. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.048
- Mendes, P.A.S., Hall, J., Matos, S., Silvestre, B., 2014. Reforming

Brazil's offshore oil and gas safety regulatory framework: Lessons from Norway, the United Kingdom and the United States. **Energy Policy** 74, 443–453. doi:10.1016/j.enpol.2014.08.014

Milan, M., Pualetto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M.G., Matozzo, V., 2013. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquat. Toxicol.** 126, 17–29. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.007

Milinkovitch, T., Lucas, J., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., Lefrançois, C., 2012. Effect of dispersed crude oil exposure upon the aerobic metabolic scope in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). **Mar. Pollut. Bull.** 64, 865–71. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.023

Moorhead, G., MacKintosh, C., Morrice, N., Cohen, P., 1995. Purification of the hepatic glycogen-associated form of protein phosphatase-1 by microcystin-Sepharose affinity chromatography. **FEBS Lett.** 362, 101–105. doi:10.1016/0014-5793(95)00197-H

Murakami, H.; Sano, M.; Tsukimura, T.; Yamazaki, A. 1998. The relaxation induced by indole and nonindole 5HT-agonists in the molluscan smooth muscle. **Comp. Biochem. Physiol. Part C.** 90 (1) 249-255.

Nikinmaa, M., 2014. **An Introduction to Aquatic Toxicology**, first ed., Academic Press, Oxford.

Neff, J.M., 2002. **Bioaccumulation in Marine Organisms**, Bioaccumulation in Marine Organisms. Elsevier. doi:10.1016/B978-008043716-3/50016-6

Nitto, T., Inoue, T., Node, K., 2008. Alternative spliced variants in the pantetheinase family of genes expressed in human neutrophils. **Gene** 426, 57–64. doi:10.1016/j.gene.2008.08.019

Noh, S.R., Cheong, H.-K., Ha, M., Eom, S.-Y., Kim, H., Choi, Y.-H., Paek, D., 2015. Oxidative stress biomarkers in long-term participants in clean-up work after the Hebei Spirit oil spill. **Sci. Total Environ.** 515-516, 207–14. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.039

NRC. 2003. **Oil in the sea - inputs, fates and effects**. National Research Council National Academy Press, Washington, 265p.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. **Bioindicators & Biomonitoring - Principles, Concepts and Applications, Trace Metals and other Contaminants in the Environment**, Trace Metals and other

Contaminants in the Environment. Elsevier. doi:10.1016/S0927-5215(03)80147-9

OGP (International Association of Oil and Gas Producers). 2005. **Fate and Effects of Naturally Occurring Substances in Produced Water on the Marine Environment**. The International Association of Oil and Gas Producers. Report 364, 36 p.

Oliva, M., González de Canales, M.L., Gravato, C., Guilhermino, L., Perales, J.A., 2010. Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, 1842–51. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.08.035

Panfoli, I., Burlando, B., Viarengo, A., 2000. Effects of heavy metals on phospholipase C in gill and digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.** 127, 391–397. doi:10.1016/S0305-0491(00)00272-8

Pessatti, T.B., Lüchmann, K.H., Flores-Nunes, F., Mattos, J.J., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Dias Bairy, A.C., 2016. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** doi:10.1016/j.ecoenv.2016.04.003

Piazza, R.S., Trevisan, R., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Wendt, N., Mattos, J.J., Lima, D., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Mello, Á.C.P., Zacchi, F.L., Serrano, M.A.S., Gomes, C.H.A.M., Bicego, M.C., Almeida, E.A. d., Bairy, A.C.D., 2016. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquat. Toxicol.** doi:10.1016/j.aquatox.2016.05.025

Pitari, G.; Malergue, F.; Martin, F.; Philippe, J.M.; Massucci, M.T. Chabret, C.; Maras, B.; Duprè, S.; Naquet, P; Galland, F., 2000. Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. **FEBS Letters** v. 483, issue 2-3, p. 149–154. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02110-4

Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M., 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.** 16, 159–178. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.004

Pushparajah, D. S.; Umachandran, M.; Plant, K. E.; Plant, N.; Ioannides,

C. Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. **Mutagenesis** vol. 23 no. 4 pp. 299–308, 2008. doi:10.1093/mutage/gen012

Ribeiro, M.J., Serfözö, Z., Papp, A., Kemenes, I., O'Shea, M., Yin, J.C.P., Benjamin, P.R., Kemenes, G., 2003. Cyclic AMP response element-binding (CREB)-like proteins in a molluscan brain: cellular localization and learning-induced phosphorylation. **Eur. J. Neurosci.** 18, 1223–1234. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02856.x

Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P., Cachot, J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. **Aquat. Toxicol.** 79, 65–77. doi:10.1016/j.aquatox.2006.05.005

Rui, L. Energy metabolism in the liver, 2014. **Com. Physiol.** 4, 177. doi: 197. 10.1002/cphy.c130024

Shen, D.-K., Noodeh, A.D., Kazemi, A., Grillot, R., Robson, G., Brugère, J.-F., 2004. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 239, 87–93. doi:10.1016/j.femsle.2004.08.019

Silva, C.A., Oliveira Ribeiro, C.A., Katsumiti, A., Araújo, M.L.P., Zandoná, E.M., Costa Silva, G.P., Maschio, J., Roche, H., Silva de Assis, H.C., 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, 400–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.03.009

Steiling, H., Wustefeld, T., Bugnon, P., Brauchle, M., Fassler, R., Teupser, D., Thiery, J., Gordon, J.I., Trautwein, C., Werner, S., 2003. Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration. **Oncogene** 22, 4380–4388.

Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., Nagasawa, H., 2009. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. **Science** (80-.). 325. doi:10.1126/science.1173793

Tanguy, A., Boutet, I., Moraga, D., 2005. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental

- stage. **Biochim. Biophys. Acta** 1681, 116–25. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.10.010
- Tian, S., Pan, L., Sun, X., 2013. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a]pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. **Aquat. Toxicol.** 144–145, 162–71. doi:10.1016/j.aquatox.2013.09.031
- Tian, S., Pan, L., Zhang, H., 2014. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression modulation following exposure to benzo[a]pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. **Mar. Environ. Res.** 94, 7–15. doi:10.1016/j.marenvres.2013.11.001
- Trevisan, R., Delapiedra, G., Mello, D.F., Arl, M., Schmidt, É.C., Meder, F., Monopoli, M., Cargnin-Ferreira, E., Bouzon, Z.L., Fisher, A.S., Sheehan, D., Dafre, A.L., 2014. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress. **Aquat. Toxicol.** 153, 27–38. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.018.
- Trevisan, R., Mello, D.F., Delapiedra, G., Silva, D.G., Arl, M., Danielli, N.M., Metian, M., Almeida, E.A., Dafre, A.L., 2016. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. **Aquat. Toxicol.** 173, 105–119. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.01.008
- Tuckwell, D., 1999. Evolution of von Willebrand factor A (VWA) domains. **Biochem. Soc. Trans.** 27, 835–840.
- Viarengo, A., Nicotera, P., 1991. Possible role of ca²⁺ in heavy metal cytotoxicity. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.** 100, 81–84. doi:10.1016/0742-8413(91)90127-F
- Wang, C., You, Y., Wang, H., Liu, B., 2012. Genetic diversity of the sulfotransferase-like gene and one nonsynonymous SNP associated with growth traits of clam, *Meretrix meretrix*. **Mol. Biol. Rep.** 39, 1323–1331. doi:10.1007/s11033-011-0865-4
- Whittaker, C.A., Hynes, R.O., 2002. Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A Domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere. **Mol. Biol. Cell** 13, 3369–3387. doi:10.1091/mbc.E02-05-0259
- Wootton, E., Dyrinda, E., Ratcliffe, N., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). **Fish**

- Shellfish Immunol.** 15, 195–210. doi:10.1016/S1050-4648(02)00161-4
- Xiu, M., Pan, L., Jin, Q., Miao, J., 2015. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 170, 50–9. doi:10.1016/j.cbpc.2015.02.003
- Xu, S., Cai, L., Zhao, L., Douhan-Håkansson, L., Kristjánsson, G., Pauksen, K., Venge, P., 2010. Tissue localization and the establishment of a sensitive immunoassay of the newly discovered human phospholipase B-precursor (PLB-P). **J. Immunol. Methods** 353, 71–7. doi:10.1016/j.jim.2010.01.005
- Zarai, Z., Boulais, N., Marcorelles, P., Gobin, E., Bezzine, S., Mejdoub, H., Gargouri, Y., 2011. Immunohistochemical localization of hepatopancreatic phospholipase in gastropods mollusc, *Littorina littorea* and *Buccinum undatum* digestive cells. **Lipids Health Dis.** 10, 1–10. doi:10.1186/1476-511X-10-219
- Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wang, Q., Li, F., Cong, M., Li, L., Zhao, J., Liu, D., Yu, J., Wu, H., 2011. Benzo(a)pyrene-induced metabolic responses in Manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance ((1)H NMR) based metabolomics. **Environm. Toxicol. Chem.** 32, 218-225. doi: 10.1016/j.etap.2011.05.006.
- Zhou, Z., Wang, L., Gao, Y., Wang, M., Zhang, H., Wang, L., Qiu, L., Song, L., 2011a. A monoamine oxidase from scallop *Chlamys farreri* serving as an immunomodulator in response against bacterial challenge. **Dev. Comp. Immunol.** 35, 799–807. doi:10.1016/j.dci.2011.03.014
- Zhou, Z., Yang, J., Wang, L., Zhang, H., Gao, Y., Shi, X., Wang, M., Kong, P., Qiu, L., Song, L., 2011b. A Dopa Decarboxylase Modulating the Immune Response of Scallop *Chlamys farreri*. **PLoS One** 6, e18596.
- Zhu, B., Wu, X., 2008. Characterization and function of CREB homologue from *Crassostrea ariakensis* stimulated by rickettsia-like organism. **Dev. Comp. Immunol.** 32, 1572–1581. doi:10.1016/j.dci.2008.05.012

CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS

A qualidade da água é um dos fatores principais para que a aquicultura possa se desenvolver, no sentido de promover a qualidade dos animais que servirão de alimento aos consumidores. O cultivo de moluscos é realizado principalmente em áreas abrigadas, baías e enseadas, que estão constantemente recebendo um aporte generoso de inúmeras misturas complexas ricas em contaminantes, provenientes de efluentes urbanos, derivados de atividades da indústria do petróleo e da ineficiência na coleta e tratamento do esgoto sanitário. Independentemente da origem dos contaminantes, muitos deles podem causar intoxicação nos animais expostos, cujas respostas biológicas podem ser utilizadas como biomarcadores em programas de monitoramento ambiental. No entanto, para tornar uma ferramenta viável em programas de biomonitoramento, faz-se necessário consecutivos e exaustivos estudos, resultando em dados consistentes para a construção de pacotes tecnológicos de biomarcadores bioquímicos e moleculares responsáveis.

A utilização de moluscos bivalves em estudos ecotoxicológicos vem se caracterizando como uma ferramenta bastante promissora. A espécie de vieira *N. nodosus* é encontrada naturalmente em áreas de baixa e média profundidade, é cultivada em áreas costeiras, possui movimentação lenta, é filtradora e bioacumuladora, e representa um importante recurso nutricional e econômico para as populações de áreas costeiras. Portanto, é considerada um organismo bioindicador potencial para utilização em programas de biomonitoramento de águas contaminadas.

Sendo assim, destacamos que:

- As vieiras *N. nodosus* possuem a capacidade de bioacumular HPAs em seus tecidos, o que, do ponto de vista ambiental, pode ser uma nova perspectiva a ser avaliada, no sentido da utilização dos animais como forma de mitigação dos impactos ambientais causados pelos derrames provenientes da indústria petrolífera e outras formas de contaminação aquática.

- As vieiras *N. nodosus* possuem a capacidade de eliminar os HPAs de seus tecidos através de protocolos de depuração. Porém, apesar da depuração ter reduzido os níveis de fenantreno em 2,5–2,9 vezes (nas concentrações de 50 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), os tecidos das vieiras ainda continham fenantreno. Neste caso, as vieiras que foram expostas à menor concentração praticamente retornaram ao nível basal, no entanto, as expostas à maior concentração, continuaram com os

níveis em aproximadamente 7,14 vezes maior do que o controle. Desta forma, 96 h de depuração não foi suficiente para que as vieiras eliminassem a concentração diária de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de fenantreno de seus tecidos, sendo necessária a realização de mais estudos para verificar em quanto tempo os animais conseguiriam retornar aos níveis basais, para fins de comercialização e consumo.

- Os protocolos de depuração utilizados no Brasil ainda não são aplicáveis em escala industrial. Primeiramente, por não existir legislação que limite a quantidade máxima dos contaminantes nos tecidos dos animais. Além disso, não existem dados suficientes sugerindo um protocolo de depuração eficiente, que garanta a eliminação dos microrganismos indesejados e substâncias químicas dos tecidos dos animais, em tempo hábil, sendo viável para a comercialização em larga escala. Portanto, é necessário que mais estudos sejam realizados para sanar a problemática e regulamentar a atividade aquícola, visando o aumento da qualidade dos animais para consumo.

- Os dados obtidos neste estudo demonstraram alterações na atividade de biomarcadores bioquímicos e moleculares clássicos, como alterações nas atividade das enzimas GPx e GR, alteração na estabilidade de membrana (MDA) e alterações em genes participantes das vias de biotransformação, nas brânquias das vieiras após exposição ao fenantreno; e alterações em genes de biotransformação, de vias de sinalização celular e funções imunes, após a exposição ao óleo cru em brânquia e glândula digestiva; demonstrando serem interessantes biomarcadores para a utilização em estudos posteriores.

- Os genes *CYP2U1-like*, *CYP2D20-like*, *CYP3A11-like*, *GST_omega-like* e *SULT1B1-like* foram responsáveis aos HPAs apresentando aumentos nos seus níveis após a exposição em ambos os tecidos e experimentos, validando o papel das enzimas de fase I (CYP) e fase II (GST, SULT) na biotransformação de HPAs em vieiras. Assim, propomos a utilização destes genes para detecção de HPAs em análises de biomonitoramento.

- Da mesma forma, os genes citados acima apresentaram restabelecimento dos seus níveis basais de transcrição (exceto *SULT1B1-like*) após a depuração; assim como as enzimas GPx e GR; demonstrando que as respostas estão intimamente ligadas à exposição de HPAs, validando o uso dos mesmos no biomonitoramento de áreas potencialmente afetadas por HPAs e demonstrando que a depuração foi eficiente do ponto de vista ambiental.

- Os genes ligados às funções imunes (*VNN1-like* e *YELL-like*), metabolismo energético (*PLB1-like*, *CREB2-like* e *GBS76A-like*) e

reparo celular (*FGFR2-like*) apresentaram aumento dos seus níveis nas brânquias após a exposição ao óleo cru, o que pode indicar um processo ligado ao evento de exposição à HPAs, mas também diretamente ligado às defesas celulares. Portanto, sugerimos que mais estudos possam ser realizados no intuito de caracterizar as respostas destes genes perante diferentes substâncias químicas, em diferentes tecidos.

Informações geradas a partir da influência dos contaminantes na ativação de vias metabólicas específicas em moluscos bivalves é de fundamental importância para a compreensão da modulação da transcrição gênica e das respostas observadas em biomarcadores moleculares/bioquímicos. Este trabalho visou abranger o conhecimento de genes de biotransformação; contribuir para a compreensão de diferentes aspectos da bioquímica, biologia molecular e da fisiologia de vieiras *N. nodosus*, bem como de espécies relacionadas; contribuir para o entendimento de novos possíveis genes biomarcadores e vias metabólicas que participam; e, identificar genes que ainda não foram bem explorados em moluscos bivalves. Portanto, futuros trabalhos devem ser realizados, tanto com contaminantes isolados, mas também com misturas de substâncias presentes no ambiente, para que os aspectos analisados em laboratório possam reunir respostas aplicáveis aos ambientes naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDEL-SHAFY H. I.; MANSOUR M. S. M. A. Review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, 2016. **Egyptian Journal of Petroleum** 25:107–123. doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

ALMEIDA, A. et al. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.** 146, 588–600, . doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040

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

AZEVEDO, DÉBORA DE A.; GERCHON, ELAINE., REIS, EDERSON O. Monitoring of Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water from Paraíba do Sul River, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, vol. 15, 292-299, 2004.

BAINY, A.C.D. et al., 2000. Biochemical responses in farmed mussel Perna perna transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 411-416.

BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H., MICHON, Q., GARRIGUES, P., BURGEOT, T. & BELLOCQ J. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment Records. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 47, 77-90, 1998.

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

BENZIE, I. F. F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261.

BERTOLETTI, E. Ensaios biológicos com organismos aquáticos e suas aplicações no controle da população. São Paulo: CETESB, 1990.

BIHARI, N.; FAFANDEL, M.; PIŠKUR, V., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 3, p. 379-387.

BLANCHETTE, B., FENG, X., SINGH, B.R., 2007. Marine glutathione S-transferases. **Marine Biotechnology** (NY). 9, 513–542. doi:10.1007/s10126-007-9034-0

BOUTET, I., MEISTERTZHEIM, A.-L., TANGUY, A., THÉBAULT, M.-T., MORAGA, D., 2005. Molecular characterization and expression of the gene encoding aspartate aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 140, 69–78. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.001

BRAGA, ELISABETE S.; BONETTI, CARLA V. D. H.; BURONE, LETICIA; BONETTI, JARBAS FILHO. Eutrophication and Bacterial Pollution Caused by Industrial and Domestic Wastes at the Baixada Santista Estuarine System, Brazil. **Marine Pollution Bulletin** Vol. 40, No. 2, pp. 165-173, 2000.

BRULLE, F. et al., 2008. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, 1441-1453.

BUITRAGO, J.; RADA, M.; HERNÁNDEZ, H.; BUITRAGO, E. A. Single-Use Site Selection Technique, Using GIS, for Aquaculture Planning: Choosing Locations for Mangrove Oyster Raft Culture in Margarita Island, Venezuela. **Environmental Management**, New York, v. 35, n. 5, p. 544-556, 2005.

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

CAS REGISTRY – **A division of the American Chemical Society – Chemical Substances**, 2016. <http://www.cas.org/>. Acesso em 30/08/2016.

CEBDSa - Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável – **Impacto da Universalização do Saneamento Básico**, 2014. <http://cebds.org/impacto-da-universalizacao-saneamento-basico/>. Acesso em 15/07/2016.

CEBDSb - Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável – **Saneamento: mazela nacional que afeta os trabalhadores**, 2014. <http://cebds.org/saneamento-mazela-nacional-que-afeta-os-trabalhadores/>. Acesso em 15/07/2016.

CHAPMAN, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 7-15.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005, publicada no DOU n.º 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 13/11/2016.

DELGADO, B. et al. Nonionic surfactant mixtures: a new cloud-point extraction approach for the determination of PAHs in seawater using HPLC with fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 518, n. 1, p. 165-172, 2004.

DONDERO, F., PIACENTINI, L., MARSANO, F., REBELO, M., VERGANI, L., VENIER, P., VIARENGO, A., 2006. Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene*, 376, 24–36. doi: 10.1016/j.gene.2006.02.015

EPAGRI. Moluscos bivalves. **Medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia**, 2016.

http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2014/05/Moluscos_bivalves_abril-2014.pdf. Acesso em 01/09/2016.

EPAGRI. **Síntese Informativa da maricultura, 2016.** <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese-Informativa-Maricultura-2015.pdf>. Acesso em 01/09/2016.

FAO. Lee, R., Lovatelli, A. & Ababouch, L. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. **Fisheries Technical Paper**, n. 511, 2008.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la pesca y la Acuicultura, 2016. **Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos.** Roma. 224 pp. <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>. Acesso em 30/08/2016.

FLORES-NUNES, F. **Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário.** Tese de doutorado, UFSC, 2013.

FREIRE, M. M. et al., 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.** 12 (3) 347-354, 2008.

GIULIANI, M.E., BENEDETTI, M., ARUKWE, A., REGOLI, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. **Aquatic Toxicology**, 134-135, 120–7. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.03.012

GLATT, H., BOEING, H., ENGELKE, C.E., MA, L., KUHLOW, A., PABEL, U., POMPLUN, D., TEUBNER, W., MEINL, W., 2001. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 482, 27–40. doi:10.1016/S0027-5107(01)00207-X

GRINTZALIS, K., GEORGIU, C. D., DAILIANIS, S. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels.

Marine Environmental Research, 2012, 81, 26–34. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.08.004

GUENGERICH, F. P., 1987. **Mammalian Cytochrome P450**. CRC Press, Boca Raton, FL.

GUIMARÃES I. M.; ANTONIO, I. G.; PEIXOTO, S.; OLIVEIRA, A. Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.41, p.118-122, 2008.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HALPERN, B.S. et. al. A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, v. 319, p. 948-952, 1998.

HANNAM, M. L., BAMBER, S. D., GALLOWAY, T. S., JOHN MOODY, A., JONES, M. B., 2010. Functional immune response in *Pecten maximus*: combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. **Fish Shellfish Immunology**, 28, 249–52. doi: 10.1016/j.fsi.2009.10.018

HANNEMANN, F., BICHET, A., EWEN, K.M., BERNHARDT, R., 2007. Cytochrome P450 systems- biological variations of electron transport chains. **Biochimica et Biophysica Acta** 1770, 330–44. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.07.017

HUGGETT, R. et al. Introduction. In: **BIOMARKERS: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, USA, 1992.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – **Relatório de Acidentes Ambientais**, 2014. <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/category/36-p?download=9348%3Arelatrio-acidentes-ambientais-registrados-pelo-ibama-em-2013>. Acesso em 30/08/2016.

IBGE. **Perfil dos municípios brasileiros**. 2005. <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv5651.pdf>. Acesso em 19/01/2017.

INOUE, M.; SATO, E. F; NISHIKAWA, M.; PARK, A. M.; KIRA, Y.; IMADA, I; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 23, p. 2495–2505, 2003.

JAYAPAL, M. et al., 2010. Environmental toxicogenomics: a post-genomic approach to analysing biological responses to environmental toxins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 230-240.

LARI, E., ABTAHI, B., HASHTROUDI, M.S. The effect of the water soluble fraction of crude oil on survival, physiology and behaviour of Caspian roach, *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870), 2016. **Aquatic Toxicology**. 170, 330–4. doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.003

LARUELLE, G. G. et al. Global multi-scale segmentation of continental and coastal waters from the watersheds to the continental margins. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 9, n. 10, p. 11319–11361, 2012.

LEAL DIEGO, A.G., et al. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean Coastal Management**, v. 72, p. 93–100. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2011.07.010

LIMA, E. S., ABDALA, D. S. P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 293-303.

LUCKENBACH, T.; EPEL, D. ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, p. R1919-1929, 2008.

LUCHMANN, K. H., 2012. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais**, 178 f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MAM, 2014 – Ministério da Agricultura e do Mar. Direção Geral de Alimentação Veterinária. **Controlo Oficial de Moluscos Bivalves Vivos: Guia de Orientação**. Direção de Serviços de Segurança Alimentar; Divisão de Controlo da Cadeia Alimentar; Governo de Portugal. file:///C:/Users/R%C3%94MI/Downloads/Rec%2010-2%20Guideline_MBV.pdf. Acesso em 02/09/2016.

MARDIS, E. R., 2008. The impact os next-generation sequencing technology on genetics. **Trend in Genetics**, v. 24, n. 3, p. 133-141.

MARTINS, M., COSTA, P.M., FERREIRA, A.M., COSTA, M.H., 2013. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. **Aquatic Toxicology**, 142-143, 85–95. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.07.019

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 2000.

MEYER, E. et al., 2009. Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSFlx. **BMC Genomics**, v. 10, p. 219.

MIAO, J. et al., 2011. Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to benzo[a]pyrene exposure. **Marine Genomics**, v. 4, p. 99-108.

NCCOS - National Centers for Coastal Ocean Science Data Collections, 2017. <https://products.coastalscience.noaa.gov/collections/ltmonitoring/nsandt/default.aspx>

NEBERT, D W.; KARP, C L, Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): Intersection of Cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized Eicosanoids and AHR Biology, **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 52, p. 36061-36065, 2008.

NEBERT, D.W.; RUSSELL, D.W., 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet**, v. 360, p. 1155-1162.

NING, D., WANG, H., DING, C., LU, H. Novel evidence of cytochromeP450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. **Biodegradation** 21, 889–901, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-010-9349-9>.

NOGUEIRA, P. et al., 2010. **Novel potential molecular biomarkers of aquatic contamination in *Dicentrarchus labrax* and *Liza aurata***. In: HAMAMURA, N. et al. (Eds.). Interdisciplinary studies on environmental chemistry - biological responses to contaminants. Aveiro: Terrapub, p. 127-138.

NOH, S.R., CHEONG, H.-K., HA, M., EOM, S.-Y., KIM, H., CHOI, Y.-H., PAEK, D. Oxidative stress biomarkers in long-term participants in clean-up work after the Hebei Spirit oil spill. **Sci. Total Environ.** 515-516, 207–14, 2015. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.039

OMIECINSKI, C.J. et al., 2011. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, p. S49-S75.

PATETSINI, E., DIMITRIADES, B. K., KALOYIANNI, M., 2013. Biomarkers in marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, expose to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 338-345.

PETROBRÁS. Pré-sal. <http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/pre-sal/>. Acesso em 19/01/2017.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154, 2007.

POYNTON, H. C.; WINTZ, H.,; VULPE, C. D. Progress in ecotoxicogenomics for environmental monitoring, mode of action, and toxicant identification. **Adv Exp Biol** 2:21–323, 2008. doi: 10.1016/S1872-2423(08)00002-1

PRÓSPERI, V. A.; NASCIMENTO, I. A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos – SP.: RIMA Editora. 2006. p. 269-346.

REGOLI, F. et al., 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 912-922.

RHEE, J.-S., LEE, Y.-M., HWANG, D.-S., LEE, K.-W., KIM, I.-C., SHIN, K.-H., RAISUDDIN, S., LEE, J.-S., 2007. Molecular cloning and characterization of omega class glutathione S-transferase (GST-O) from the polychaete *Neanthes succinea*: biochemical comparison with theta class glutathione S-transferase (GST-T). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, 146, 471–7. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.05.003

RIOS, E. **Compendium of brasilian sea shell from Brasil**. Rio Grande. Evangraf, LTDA. P. 676, 2009.

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

RUPP, G. S., PARSONS, G. J. Scallop aquaculture and fisheries in Brazil. In: SHUMWAY, S. E.; PARSON, G. J. (Eds.). **Scallop: Biology Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science**. 2. Ed. Elsevier. Amsterdam. p. 1225-1250, 2006.

SARKAR, A. et al., 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring, **Ecotoxicology**, v.15, n.4, p.333-340.

SEKOVSKI, I.; NEWTON, A.; DENNISON, W. C. Megacities in the coastal zone: Using a driver-pressure-state-impact-response framework to address complex environmental problems. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 96, p. 48–59, 2012.

SERICANO, J.L., WADE, T.L., BROOKS, J.M. Accumulation and depuration of organic contaminants by the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Sci. Total Environ.* 179, 149–160, 1996. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)90054-6](http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(96)90054-6)

SIES, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 31S-38S.

SOUZA, D.S.M., et al. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**, 167, 337–345, 2013. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.019>

STEINBERG, C. E. W.; STÜRZENBAUM, S. R.; MENZEL, R. Genes and environment — Striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. **Sci Total Environ**, 2008, 400:142–161. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.07.023

STOREY, K. B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 12, p. 1715-1733.

SÜß, J., VOLZ, S., OBST, U., SCHWARTZ, T., 2009. Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. **Water Research**. 43, 3705–3716. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.048>

TEMPLAR, H. A.; DILA, D. K.; BOOTSMA, M. J. Quantification of human-associated fecal indicators reveal sewage from urban watersheds as a source of pollution to Lake Michigan, 2016. **Water Research** 100:556–567. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.056

TREVISAN, R. **Mecanismos de defesas celulares relacionados a Defesas antioxidantes e de biotransformação em mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* expostas a agentes oxidantes e eletrofílicos**. Tese de doutorado, UFSC, 2014.

TANGUY, A., BOUTET, I., MORAGA, D., 2005. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochemical Biophysic. Acta* 1681, 116–25. doi: 10.1016/j.bbaexp.2004.10.010

TELLI-KARAKOÇ, F. et al., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) distributions in the Bay of Marmara Sea: Izmit Bay. **Environmental Pollution**, v. 119, n. 3, p. 383-397.

TIAN, S., PAN, L., ZHANG, H., 2014. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression modulation following exposure to benzo[a]pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. **Marine Environmental Research**, 94, 7-15. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.11.001

WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M. AND PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis Group, Boca raton, FL, 2006.

WALKER, C.W. et al., 2011. **p53 superfamily proteins in marine bivalve cancer and stress biology**. In: LESSER, M. (Ed.). Advances in marine biology. Oxford: Academic Press, 2011. v. 59, p. 1-36.

WAXMAN, D J; AZAROFF, Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression, **Biochemical Journal**, v. 28, n. 3, p. 577-592, 1992.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, **Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data**, 32. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 1983. P. 477.

WU, Y. et al., 2011. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from the Western Taiwan Strait, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5, p. 459-463.

UNFPA – **United Nations Population Fund, 2016** - <http://www.unfpa.org.br/>. Acessado em 30/08/2016

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Priority pollutants**, 2014. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>. Acesso em: 19/01/2017

VRANA, B.; PASCHKEA, A.; POPP, P.,2001. Polyaromatic hydrocarbon concentrations and patterns in sediments and surface water of the Mansfield region, Saxony-Anhalt, Germany. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 3, p. 602–609.

XIU, M., PAN, L., JIN, Q., MIAO, J. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 170, 50–9, 2015. doi:10.1016/j.cbpc.2015.02.003

ZACCHI, F.; et al., 2017. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, 183 (2017) 94–103

ZHANG, G. et al. Molecular Basis for Adaptation of Oysters to Stressful Marine Intertidal Environments. **Annu. Ver. Anim. Biosci.** 4:357–381, 2015. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110903