

**Priscilla Maria Menel Lemos**

**Respostas bioquímicas e moleculares em  
mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos  
ao óleo diesel.**

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Florianópolis 2003**

**Priscilla Maria Menel Lemos**

**Respostas bioquímicas e moleculares em  
mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos  
ao óleo diesel.**

**Dissertação apresentada ao  
programa de Pós –Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal de Santa Catarina, visando  
à obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia.**

**Orientador: Prof Dr. Afonso Celso Dias  
Bainy.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi**

**Florianópolis 2003**

Lemos, Priscilla Maria Menel

Respostas bioquímicas e moleculares em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) expostos ao óleo diesel/ Priscilla Maria Menel Lemos. – Florianópolis, 2003.

155 f.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Biomarcadores de contaminação aquática. 2. Mexilhões *Perna perna*. 3) óleo diesel. I. Título.

***"Seja a mudança que você quer ver no mundo."***

**Mahatma Gandhi**

*Dedico esta dissertação ao Brasil. A toda a população brasileira que sobrevive, que resiste, que tolera tanta situação adversa e que merece ser conservada e protegida. A este povo que tem o direito de ver o seu bem estar conservado, suas riquezas preservadas e o seu futuro garantido. Espero contribuir com minha pequena parcela na construção de uma realidade melhor, retribuindo o investimento deste povo, que permitiu todos estes anos de estudo e pesquisa em Universidades Federais.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço aos meus pais e irmãs pelo apoio afetivo, psicológico e financeiro ao longo desta jornada. Pelos exemplos e valores compartilhados e pela compreensão, nem sempre uma conquista fácil. Agradeço aos meus amigos, verdadeiros irmãos de coração, por serem tão maravilhosos e por terem enriquecido tanto a minha vida. Agradeço a toda a "família" científica do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica. Principalmente aos professores, Dr. Afonso C. D. Bairy e Dr<sup>a</sup>. Maria Risoleta F. Marques, por haverem fornecido os meios necessários para execução deste trabalho. Pela confiança, pela orientação, pela competência e pela amizade demonstrada. As colegas de pesquisa "que meteram a mão na massa": Taíse Bressolin, que compartilhou comigo todos os aspectos do trabalho sobre a expressão da Pgp, Daniella B. B. Trivella, minha principal "dupla", agradeço a amizade, a afinidade no trabalho e nas idéias, que permitiu que a pesquisa sobre a atividade da Pgp fosse executada de maneira fluida e consonante, "um concerto a quatro mãos" e Eliana C. Ventura, pela amizade e apoio essencial no momento mais difícil deste trabalho, sem a sua ajuda, seria muito difícil fazer tudo o que fizemos. Agradeço ao Laboratório de Expressão Gênica e Interação DNA/Proteína, principalmente ao Prof. Dr. Hernán Terenzi, pela co-orientação e apoio a minha pesquisa. Agradeço, também, a seus orientados que me introduziram ao universo da Biologia Molecular, na prática. Agradeço ao Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, que forneceu os mexilhões da zona de cultivo da Praia do Sambaqui e os dados das análises ambientais. Agradeço a Epagri e ao Climerh, na pessoa de Patrícia Sunye, pelos dados climáticos fornecidos. Agradeço a CAPES, pela bolsa que permitiu a minha dedicação exclusiva a esta pesquisa. Aos apoios financeiros que permitiram a execução do nosso projeto, provenientes CTPetro, Plano Sul de Pesquisa.*

## SUMÁRIO

<i>Dissertação</i>		<i>Página</i>
<b>Introdução Geral</b>		1
Poluição dos ecossistemas aquáticos		1
Petróleo e derivados		5
Óleo diesel		9
Estudos ecotoxicológicos e a utilização de biomarcadores		10
Estratégias bioquímicas e moleculares de adaptação e resistência aos xenobióticos		12
Mexilhões: relevância sócio-econômica e em estudos ambientais		22
Aspectos biológicos de <i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758)		23
<b>Capítulo 1</b>		27
<b>Resposta de biomarcadores no mexilhão <i>Perna perna</i> transferido para um local contaminado na Ilha de Santa Catarina, Brasil</b>		
Resumo		28
Texto		29
Referências		32
<b>Capítulo 2</b>		36
<b>Avaliação do mecanismo MXR em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao óleo diesel</b>		
Resumo		37
Abstract		38
Introdução		39
Material e Métodos		41
Resultados		47
Discussão		51
Referências		61
<b>Capítulo 3</b>		76
<b>Avaliação do mecanismo MXR em mexilhões <i>Perna perna</i> coletados na Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil</b>		
Resumo		77
Palavras-chave		77
Abstract		78
Introdução		79
Material e Métodos		81
Resultados		85
Discussão		88
Referências Bibliográficas		99
<b>Capítulo 4</b>		110
<b>Aplicação da técnica de ddPCR (differential display PCR) em mexilhões <i>Perna perna</i> (L.) (Bivalvia, Mytilidae) expostos ao óleo diesel (0,1%)</b>		
Abstract		111
Resumo		112

Introdução	113
Material e Métodos	116
Resultados	124
Discussão	125
Referências	131
<b>Discussão Final e Conclusões</b>	<b>140</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>143</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i><b>Página</b></i>
<b>Introdução Geral</b>	
Figura 1A - Mapa da densidade demográfica no Brasil	4
Figura 1B – Mapa da distribuição das indústrias no Brasil	4
Figura 2 – Esquema geral da técnica de ddPCR	14
Figura 3 – Modelos propostos para a estrutura da Pgp	17
Figura 4 - Modelos propostos para o transporte via Pgp	18
Figura 5 – Morfologia externa e interna dos mexilhões <i>Perna perna</i>	26
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Resposta de biomarcadores no mexilhão <i>Perna perna</i> transferido para um local contaminado na Ilha de Santa Catarina, Brasil</b>	
Figura 1 - Expressão da Heat shock protein 60 (Hsp60), da Heat shock protein 70 (Hsp70) e da Glicoproteína-P (Pgp); atividade da Pgp e da Glutathione <i>S</i> -transferase (GST) nas brânquias do mexilhão <i>Perna perna</i> mantidos no local referência e no local contaminado por 0, 1, 7 e 14 dias	34
Tabela 1 - Correlação entre as médias dos dados biológicos (biomarcadores) e os parâmetros ambientais	35
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Avaliação do mecanismo MXR em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao óleo diesel</b>	
Figura 1 – Ilha de Santa Catarina - SC. Localização do ponto de coleta dos mexilhões, na área de cultivo da Praia do Sambaqui e localização do ponto avaliado no experimento <i>in situ</i> , Baía Norte, nas proximidades da Ponte Hercílio Luz	66
Figura 2 - Banda de reação positiva detectada nas brânquias de <i>Perna perna</i> , através de western blotting, utilizando o anticorpo monoclonal C219	67
Figura 3 - Acúmulo de ROD observado nos ensaios de exposição simultânea a ROD e óleo diesel	68
Figura 4 - Acúmulo de ROD observado nos ensaios de exposição simultânea a ROD e diferentes concentrações de óleo diesel	69
Figura 5 - Avaliação da entrada de ROD na célula após a pré-exposição ao óleo diesel durante 1h e 24h nos mexilhões submetidos a aclimação em laboratório (4 dias) e durante 5h e 24h nos mexilhões não aclimatados	70
Figura 6 - Concentração de Pgp medida através de Western blotting, em amostras de brânquia dos mexilhões pré-expostos ao óleo diesel 0,1%, submetidos a aclimação (4 dias) e não submetidos a aclimação	71
Figura 7 - Avaliação da entrada de ROD na célula com e sem pré-exposição ao óleo diesel, seguida ou não da renovação da água do mar	72
Figura 8 - Avaliação do efluxo de ROD na presença de óleo diesel	73
Figura 9 - Avaliação do mecanismo MXR após exposição a contaminantes <i>in situ</i>	74
Tabela 1 - Avaliação do mecanismo MXR após exposição a contaminantes <i>in situ</i> . Correlação entre as médias da atividade da Pgp (Pgp act), da expressão da Pgp (Pgp exp) e os parâmetros ambientais analisados	75

(temperatura- ToC, pH, turbidez - Turb e clorofila- Chl A)

<b>Capítulo 3</b>	76
<b>Avaliação do mecanismo MXR em mexilhões <i>Perna perna</i> coletados na Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil</b>	
Figura 1 – Mapa da Ilha de Santa Catarina-SC. Detalhes mostram a localização do Estado de Santa Catarina em relação a América Latina e a localização da Ilha de Santa Catarina dentro do Estado. As setas indicam os locais de coleta	104
Figura 2 - Exposição simultânea a ROD (1,5 mM) e diferentes concentrações de VER utilizando animais aclimatados por um período de 12 horas	105
Figura 3 - Exposição simultânea a ROD (1,5 mM) e diferentes concentrações de VER utilizando animais não aclimatados	106
Figura 4 - Exposição simultânea a ROD (1,5 mM) e 20 mM de VER utilizando animais provenientes das 4 localidades avaliadas	107
Figura 5 - Exposição simultânea a ROD e óleo diesel 0,1%.	108
Figura 6 - Exposição simultânea a ROD (1,5 mM) e diferentes concentrações de óleo diesel	109
<b>Capítulo 4</b>	110
<b>Aplicação da técnica de ddPCR (differential display PCR) em mexilhões <i>Perna perna</i> (L.) (<i>Bivalvia</i>, <i>Mytilidae</i>) expostos ao óleo diesel (0,1%)</b>	
Figura 1 – Ilha de Santa Catarina - SC. Localização do ponto de coleta dos mexilhões, na zona de cultivo na Praia do Sambaqui (LCMM)	135
Figura 2 - Teste de integridade do RNA Total extraído das brânquias de <i>Perna perna</i>	136
Figura 3 - Teste de qualidade do cDNA obtido após a transcrição reversa. O cDNA foi testado através de amplificação por PCR, utilizando os iniciadores ABC1 e ABC2	136
Figura 4 - Análise de amostras de brânquia dos animais que fizeram parte do experimento de exposição ao óleo diesel 0,1%. Produtos obtidos através de ddPCR utilizando os iniciadores OMP 19 e OMP 41	137
Figura 5 - Análise das amostras provenientes dos animais que fizeram parte do experimento de exposição ao óleo diesel 0,1%. Os produtos obtidos através de ddPCR utilizando os iniciadores OMP 19 e OMP 41 foram separados através de PAGE a 6%, corado com nitrato de prata	138
Figura 6 - Análise de amostras de brânquia dos animais que fizeram parte do experimento de exposição ao óleo diesel 0,1%. Produtos obtidos através de ddPCR utilizando os iniciadores T7 TER e RPET 22	139
Figura 7 Análise de amostras de brânquia dos animais que fizeram parte do experimento de exposição ao óleo diesel 0,1%. Produtos obtidos através de ddPCR utilizando os iniciadores FPET 22 e OMP 20	139

## RESUMO

A maior fonte de contaminação dos ecossistemas costeiros na Ilha de Santa Catarina-SC é a liberação de esgotos domésticos, não tratados, diretamente nos corpos d'água. A contaminação com óleo diesel é menos freqüente, ocorrendo em função da sua utilização como combustível para barcos de pesca. Os principais objetivos da pesquisa, apresentada nesta dissertação foram: 1) avaliação da viabilidade de utilização do mecanismo MXR (*multixenobiotic resistance* – resistência múltipla a xenobióticos) em mexilhões *Perna perna*, como biomarcador de contaminação aquática, 2) avaliação do envolvimento do MXR na resistência à exposição a xenobióticos, apresentada pelo *P. perna*, 3) avaliação do impacto do óleo diesel comercial sobre o MXR e sobre a população de genes transcritos em *P. perna*. A dissertação foi dividida em 4 capítulos. O capítulo I trata da aplicação de biomarcadores na avaliação do impacto da contaminação por esgoto doméstico na Baía Norte, Ilha de Santa Catarina. Os resultados indicam que o *P. perna* é resistente a este tipo de contaminação e que o aumento na indução do MXR pode estar relacionado com a manutenção da homeostase nestas condições adversas. O capítulo II se refere a experimentos laboratoriais para avaliação mais criteriosa do MXR em *P. perna*, através do estudo da expressão (*western blot*) e da atividade da Glicoproteína P (Pgp) (ensaios de acúmulo/efluxo de Rodamina B), em que mexilhões coletados na área de cultivo da Praia do Sambaqui, foram submetidos à exposição ao óleo diesel. Os resultados indicam a ausência de alterações significativas na quantidade de proteína nas brânquias dos animais expostos. No entanto, o óleo satura a capacidade de bombeamento da Pgp, sendo, portanto considerado como um possível quimiosensibilizador. No capítulo III, diferenças no MXR em *P. perna* provenientes de diferentes locais da Ilha de Santa Catarina, foram avaliadas através da análise da capacidade de transporte da Pgp, em ensaios utilizando verapamil e óleo diesel como substratos competitivos. Os resultados indicam diferenças no nível de indução do MXR relacionadas ao impacto humano aparente. A saturação da Pgp (presença de substâncias quimiosensibilizadoras no ambiente) foi observada, nos mexilhões coletados na Prainha da Barra da Lagoa, em uma freqüência maior que nos outros pontos de coleta avaliados. O capítulo IV trata da aplicação da técnica de ddPCR (*differential display PCR*), para avaliar as alterações que o óleo desencadeia no padrão de expressão gênica. Em função de problemas técnicos, não foram obtidos resultados satisfatórios nesta avaliação.

## **Introdução Geral**

### **Poluição dos ecossistemas aquáticos**

Os ambientes aquáticos recebem um enorme aporte de materiais, tanto de origem natural quanto antropogênica, tendo sido considerados por muito tempo como destino apropriado para os resíduos produzidos pela sociedade humana. Até recentemente, acreditava-se que os oceanos possuíam uma capacidade quase infinita de absorver tais resíduos e que a diluição das substâncias potencialmente tóxicas solucionava o problema (JOBLING, 1995). Atualmente, percebe-se claramente a fragilidade dos ecossistemas aquáticos e o grau de degradação em que vários destes ambientes se encontram. Deve-se salientar a importância da preservação do que ainda permanece intacto e a procura de estratégias que minimizem o impacto gerado pela sociedade humana, bem como a recuperação das áreas já degradadas (LEWIS, SCOTT & KLAINE, 2001; SUMMERS, 2001).

Segundo ROCHA (2000), grande parte do impacto antropogênico no ambiente, que teve lugar neste último século, foi causada pela combinação de dois fatores: primeiro; alterações majoritárias na concentração dos 58 elementos químicos da tabela periódica e, segundo, a criação e a introdução de uma miríade de novos compostos com potencial desconhecido de atuação nos diferentes níveis de organização dos sistemas biológicos, partindo dos níveis mais básicos, que envolvem a integridade das unidades bioquímicas funcionais (proteínas, ácidos nucléicos, lipídios e carboidratos), até os níveis superiores, que tratam das populações e comunidades. Com os avanços nas diferentes áreas do conhecimento, como a Química, a Biotecnologia e a Ciência dos Materiais, que introduziram novos produtos químicos e possibilitaram inovações em quase todas as sub-áreas da ciência e da tecnologia, assistimos ao acúmulo "silencioso" de substâncias tóxicas em todos os compartimentos da biosfera.

O surgimento de grandes centros urbanos próximos à faixa litorânea, tem promovido mudanças significativas na qualidade da água nos habitats marinhos e estuarinos, principalmente em função da liberação dos esgotos municipais e industriais não tratados, diretamente nos corpos d'água. Mas, a

poluição não é a única responsável por este declínio na qualidade do ambiente aquático, já que vastas modificações do ambiente físico alteraram os padrões naturais de fluxo das águas, com a substituição da vegetação ciliar por superfícies impermeáveis e a alteração da linha natural da costa, tornando a orla mais simétrica, de forma compatível com a especulação imobiliária (INGLISH & KROSS, 2000).

O lançamento de contaminantes nos oceanos e estuários pode provocar danos à vida aquática, riscos à saúde do homem, entrave às atividades marinhas, tais como a pesca e outras utilizações legítimas do mar, principalmente no que se refere a sua utilização direta ou em atividades recreativas associadas, conforme caracterizado pela Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (CDUM, 1985).

Segundo o "Chemical Abstract Service's Registry of Chemicals" (CAS, 2003), existem mais de 20 milhões de substâncias químicas registradas, sendo que pelo menos 4 mil são registradas a cada dia. Milhares destes compostos são utilizados rotineiramente pela nossa sociedade, como parte da revolução tecnológica que vem tendo lugar no último século (LUOMA, 1996). Quando estes compostos, através das diversas vias de transporte, alcançam os corpos d'água, podem contaminar os organismos que neles habitam, introduzindo-se nas cadeias tróficas e podendo mostrar os seus efeitos deletérios em locais afastados da fonte de emissão, mesmo após longos períodos de tempo (JOBILING, 1995).

Os problemas da poluição marinha ao longo da costa brasileira têm se agravado de maneira constante, conforme constatado pelo Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União (1:1.000.000) (BRASIL MMA, 1996). Neste levantamento, foi observado um padrão de assentamento humano bastante concentrado no litoral, com pelo menos metade da população brasileira residindo a não mais de 200 quilômetros do mar (Figura 1A), além da presença de grandes pólos industriais na faixa litorânea (associados aos centros urbanos) (Figura 1B). Apesar da evidente expansão urbana, apenas 20% da população costeira dispõem de sistemas de coleta e tratamento de esgoto, sendo 90% do lixo coletado encaminhado para aterros sanitários a céu aberto,

estando, pelo menos metade destes, localizados próximos ao mar, rios, lagoas ou áreas de preservação ambiental. Os problemas ambientais causados pelo setor industrial são considerados ainda mais graves, pois algumas indústrias liberam no ambiente uma vasta gama de substâncias conhecidamente tóxicas, principalmente através da descarga direta dos efluentes não tratados e das emissões atmosféricas (CNIO, 1998).

A maioria dos poluentes são compostos exógenos ao metabolismo normal dos organismos, sendo referidos como xenobióticos (HODGSON & LEVI, 1994). Segundo VAN LEEUWEN & HERMENS (1995) e WALKER *et al.* (1996), os xenobióticos podem ser divididos em duas grandes classes:

- inorgânicos: são em sua grande maioria metais (cátions) ou ânions. Dentre os ânions, podem ser citados, os nitratos e os fosfatos, que não são considerados particularmente tóxicos, mas que podem causar problemas ambientais (eutrofização) se utilizados em grande quantidade na forma de fertilizantes ou então, quando liberados através dos esgotos não tratados. Dentre os metais (tanto em sua forma iônica quanto associados a radicais orgânicos e inorgânicos), o cobre (Cu), o chumbo (Pb), o manganês (Mn), o zinco (Zn), o estanho (Sn), o alumínio (Al), a prata (Ag), o cádmio (Cd), o mercúrio (Hg), o cromo (Cr) e o ferro (Fe), ocupam um local de destaque, em função da sua conhecida toxicidade para os sistemas biológicos.
- orgânicos: nesta classe estão agrupados os compostos formados por esqueletos de carbono. Dentre eles, pode-se citar: os hidrocarbonetos em geral (alifáticos, ramificados, cíclicos e aromáticos), as bifenilas policloradas (PCBs), os dibenzofuranos policlorados (PCDF) e as dibenzodioxinas policloradas (PCDD), os organoclorados (inseticidas de primeira geração, DDT e compostos relacionados), os organofosforados e carbamatos (inseticidas de segunda geração), os piretróides (inseticidas de terceira geração), clorofenóis e outras classes de compostos utilizados como herbicidas, detergentes e rodenticidas.



A

FONTE: Adaptado do Anuário do IBGE - Diretoria de Geodésia, Departamento de Geografia, Sinopse Preliminar do Censo Demográfico de 1991.



B

**Figura 1:** Em (A), mapa da densidade demográfica no Brasil, indicando o assentamento hiperconcentrado ao longo da faixa litorânea. Em (B), mapa da distribuição das indústrias no Brasil, mostrando a maior concentração na proximidade da faixa litorânea.

Os xenobióticos orgânicos, em âmbito geral, são mais freqüentes nos ecossistemas aquáticos que os inorgânicos; além disso, a sua biodisponibilidade também é maior. Em função das suas características apolares, estes compostos entram facilmente nos organismos, principalmente através da via hídrica e da via trófica, atravessam as membranas biológicas passivamente e são distribuídos para os tecidos, através dos fluídos corpóreos, associados a lipoproteínas (HODGSON & LEVI, 1994; LUOMA, 1996).

### **Petróleo e derivados**

O petróleo é uma mistura complexa de compostos gasosos, líquidos e sólidos, denominados hidrocarbonetos (90-99% do volume do óleo cru), por serem constituídos quase que exclusivamente por átomos de Carbono (C) e Hidrogênio (H). Heterocompostos, contendo Nitrogênio (N), Enxofre (S) e Oxigênio (O) também ocorrem, mas em baixas concentrações. O número de átomos de carbono que formam os hidrocarbonetos do petróleo e a forma como estes se organizam (estrutura) determinam as diferentes propriedades físico-químicas destes e influenciam o seu uso como combustível, lubrificante, cera ou solvente (MÉXICO IMP, 2000).

Quanto a sua estrutura, os hidrocarbonetos podem ser divididos em (MÉXICO IMP, 2000):

- parafinas (alcanos): compostos com cadeias lineares de carbono associadas a átomos de hidrogênio. Exemplos: metano, etano, propano, butano e pentano.
- isoparafinas: compostos que apresentam cadeias de carbono ramificadas. Exemplos: isobutano, isopentano e neopentano.
- oleofinas: compostos que possuem duplas ligações entre os átomos de carbono (C=C). Exemplos: etileno, propileno, butileno e isoamileno.
- Naftenos (cicloparafinas): compostos cíclicos, ou seja que possuem anéis de carbono. Exemplos: ciclohexano, 1,1 dimetilciclopentano e decahidronaftaleno.

- aromáticos: compostos que possuem em sua estrutura anéis benzênicos. Exemplos: benzeno, tolueno, xileno, ortoxileno, naftaleno, antraceno, fenantreno e bifenila.

Os hidrocarbonetos que possuem heterocompostos em sua estrutura são divididos em:

- compostos com enxofre (S): mercaptano, tiofeno, benzotiofeno e naftobenzotiofeno.
- compostos com nitrogênio (N): pirrol, indol, piridina, carbazol e quinoleína.
- compostos com oxigênio (O): cetonas, furanos e ésteres.

O fato dos milhares de compostos formadores do petróleo possuírem características tão diversas, auxilia o processo de refino, já que diferentes compostos possuem diferentes pontos de ebulição (volatilidade), permitindo o uso da destilação fracionada neste processo. Após a destilação, o petróleo é separado em cinco frações amplas, mais ou menos homogêneas (MÉXICO IMP, 2000):

- fração gasosa: formada por gases diversos, GLP (gás de cozinha) e matéria-prima para a indústria petroquímica;
- destilado leve: solventes, gasolina e matéria-prima para a indústria petroquímica;
- destilado médio: querosene, óleo diesel, óleos lubrificantes e óleos combustíveis;
- destilado pesado: óleos lubrificantes e combustíveis;
- resíduo: lubrificantes e combustíveis de alto peso molecular e a matéria-prima para a confecção do asfalto.

Os derivados do petróleo são utilizados das mais diversas formas: como combustível de veículos de transporte (óleo diesel e gasolina), como solvente (benzina e xileno), como lubrificantes e, ainda, para obtenção de energia elétrica (usinas termoelétricas) e calorífica (sistemas de calefação). A indústria petroquímica os utiliza para a produção de plásticos, fibras sintéticas,

detergentes, drogas terapêuticas, conservantes e agroquímicos, entre outros (MÉXICO IMP, 2000).

A contaminação do ambiente marinho por hidrocarbonetos de petróleo pode ser originada a partir de diversas fontes. Entre elas estão a liberação não-controlada desses compostos durante os processo de extração e refino, os derrames acidentais, em pequena ou grande escala, durante o transporte e, ainda, a liberação direta no ambiente dos efluentes de indústrias produtoras de derivados de petróleo. Em termos quantitativos, o óleo cru pode ser considerado o poluente orgânico mais comum nos ecossistemas marinhos. Estima-se que de 1,7 a 8,8 x 10<sup>9</sup> toneladas de hidrocarbonetos derivados do petróleo atinjam os ecossistemas marinhos anualmente (HEAD & SWANNELL, 1999).

Os grandes derramamentos de petróleo, como os ocorridos com os navios *Exxon Valdez* no Alasca em 1989 e *Sea Empress* na costa sudeste de Wales em 1996, apesar da atenção recebida pela mídia, são relativamente raros, sendo a quantidade total de compostos liberada nestes acidentes bem menor que aquela originada pelos pequenos derrames que ocorrem rotineiramente durante a extração, refino e transporte do petróleo (HEAD & SWANNELL, 1999; PRINCE, 1997; SANTAS *et al.*, 1999).

No Brasil, a indústria petroquímica é a que causa o maior impacto sobre a Zona Costeira (CNIO, 1998). Os grandes campos de extração podem ser encontrados desde o litoral do Rio Grande do Norte até Santa Catarina e são conectados aos terminais e refinarias através de uma vasta rede de dutos (oleodutos e gasodutos). Além disso, existe toda uma infra-estrutura adicional necessária para o armazenamento e repasse dos produtos, formada por terminais, tanques e depósitos, que se distribuem por extensas faixas do litoral, normalmente nas imediações dos portos. Os efeitos deste setor da indústria no ambiente costeiro podem ser exemplificados pelo complexo Cubatão/Capuava no estado de São Paulo. Nesta região, aproximadamente 11.800 km<sup>2</sup> de manguezais foram derrubados e contaminados. De modo geral, o ambiente da Baía, do Estuário de Santos e de toda a Baixada Santista, sofreu um processo acentuado de degradação, tendo sido observada uma diminuição gradativa da

cobertura vegetal da Reserva Biológica da Serra de Paranapiacaba, formada em sua maioria por Mata Atlântica (CNIO, 1998).

Vários estudos já foram efetuados com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição a hidrocarbonetos sobre os organismos aquáticos. Segue uma breve revisão das alterações comumente relatadas:

- modificações na estrutura das comunidades estuarinas, com diminuição da diversidade tanto da fauna quanto da flora (ENGLISH & KROSS, 2000; CHAPMAN & WANG, 2001; LONG, HONG & SEVERN, 2001; SUMMERS, 2001);
- alteração dos padrões normais de desenvolvimento, reprodução e viabilidade da prole, variando quanto à espécie analisada (SALAZAR & SALAZAR, 1995; HOSE & BROWN, 1998; KELLER, RUESSLER & CHAFFEE, 1998; OBERDÖRSTER & CHEEK, 2001);
- efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (WURGLER & KRAMERS, 1992; KURELEC, 1993; WIRGIN & WADMAN, 1998; WILLIAMS, LECH & BUHLER, 1998; JUNG, KLAUS & FENT, 2001);
- modificações nos níveis normais de expressão e atividade de vários sistemas enzimáticos, como por exemplo o citocromo P450 (monooxigenases de função mista), envolvido com os processos de biotransformação, tanto em vertebrados quanto em invertebrados (WOOTTON *et al.*, 1995; WILLIAMS, LECH & BUHLER, 1998; PORTE *et al.*, 2001; JUNG, KLAUS & FENT, 2001) e proteínas, como as HSPs (*Heat Shock Proteins*), principalmente da HSP 70, que sob condições ambientais adversas atuam reparando proteínas desnaturadas e impedindo que estas formem agregados (NASCIMENTO *et al.*, 1998; MINIER *et al.*, 2000; PORTE *et al.*, 2001).

## **Óleo diesel**

O óleo diesel é uma mistura complexa de alcanos normais, ramificados e cíclicos (de 60 a 90% do volume, com o comprimento das moléculas variando de C<sub>9</sub> a C<sub>30</sub>), compostos aromáticos, como os alquilbenzenos (5-40% do volume) e pequenas porções de alquenos (0-10% do volume). À temperatura ambiente, apresenta uma volatilidade moderada, é inflamável, líquido, com

coloração marrom e de odor semelhante ao do querosene. Seu ponto de ebulição varia conforme a sua procedência (de 140° a 385° C), sua densidade pode variar de 0,87-1,0 g/cm<sup>3</sup> e sua solubilidade em água (a 20° C) é de 0,2-5 mg/l (EHC 171, 1996).

São poucos os dados resultantes de estudos ecotoxicológicos efetuados especificamente com o óleo diesel. Vários fatores dificultam este tipo de avaliação, entre eles, o fato da composição química do óleo diesel variar muito em função da sua procedência ou das interações físico-químicas estabelecidas com a água. Comparações diretas entre os estudos existentes são difíceis, pois as avaliações foram efetuadas em diferentes condições (estudos laboratoriais *vs* avaliações *in situ* após derrames acidentais), utilizando-se diversas espécies em diferentes estágios de desenvolvimento. Apesar destas dificuldades de avaliação sabe-se, por exemplo, que o óleo diesel é mais tóxico para organismos aquáticos e plantas, quando comparado ao óleo cru (EHC 171, 1996).

Em um estudo efetuado com larvas de 14 espécies pertencente a 5 filos diferentes (Echinodermata, Mollusca, Annelida, Arthropoda e Urochordata) expostas a 0,5% de óleo diesel n° 2 em água do mar, observou-se que, após oito dias de exposição, apenas uma das espécies de Echinodermata sobreviveu. A concentração utilizada foi letal para as larvas de todas as outras espécies, após 3 e 72 horas de exposição (EHC 171, 1996).

Após exposição crônica a óleo diesel, mexilhões da espécie *Mytilus edulis* (nativa do Hemisfério Norte) acumularam este composto em seus tecidos e registraram alterações nas taxas de alimentação, crescimento e reprodução. O EC<sub>50</sub> para mexilhões em crescimento expostos por 30 dias a esse xenobiótico é de aproximadamente 800 µg/L. O LC<sub>50</sub> para o óleo diesel microencapsulado para mexilhões adultos é de aproximadamente 5000 µg/L, após 30 dias de tratamento. O diesel mostra-se mais tóxico para as larvas que para os juvenis, em uma concentração igual a 10 µg/L. Em outro estudo, em que esta mesma espécie foi exposta ao óleo diesel por 8 meses, nas concentrações de 30 e 130 µg/L, as taxas de alimentação e crescimento mostraram-se significativamente reduzidas. O período de depuração necessário para a recuperação completa, dos animais expostos às duas doses, foi de 55 dias (EHC 171, 1996).

Por outro lado, em um estudo onde indivíduos adultos da espécie *Perna perna* foram expostos a diferentes concentrações de óleo diesel (0 - 10<sup>5</sup> µl/l), não foram detectadas modificações significativas nos parâmetros hematológicos avaliados (PIRES *et al.*, 1998), sugerindo uma aparente resistência dessa espécie de mexilhão à contaminação por hidrocarbonetos.

### **Estudos ecotoxicológicos e a utilização de biomarcadores**

A Ecotoxicologia estuda o efeito que os poluentes químicos apresentam sobre a ecologia das populações, comunidades e ecossistemas, de maneira integrada com os estudos toxicológicos, interessando-se também pela análise do destino (transporte, transformação e extinção) destes poluentes no ambiente (LUOMA, 1996). Desde que o termo ecotoxicologia foi utilizado pela primeira vez em 1969, esta Ciência tem crescido e se desenvolvido, principalmente em resposta à crescente preocupação da sociedade em relação à poluição ambiental (SOLOMON, 2000). No entanto, não se deve esquecer que o progresso dos estudos toxicológicos está diretamente vinculado com o desenvolvimento de novas metodologias de análises químicas, bioquímicas e moleculares.

As técnicas utilizadas tradicionalmente na toxicologia para a avaliação da contaminação aquática são, normalmente, voltadas para o exame da concentração total dos contaminantes no meio e dos parâmetros físico-químicos do ambiente, para a análise das flutuações observadas nas comunidades biológicas (índices de diversidade e abundância de espécies) e para a utilização de testes padronizados de avaliação da toxicidade dos xenobióticos (envolvendo exposições agudas sob condições laboratoriais e utilizando espécies exóticas, em sua grande maioria). Atualmente, um número cada vez maior de estudos tem se valido das técnicas supracitadas em associação a novas estratégias, tais como: os testes de toxicidade efetuados *in situ*, os experimentos de microcosmos (simulando a estrutura das comunidades aquáticas), o aumento do uso de espécies nativas nas avaliações ambientais e a utilização de biomarcadores bioquímicos e moleculares de exposição e/ou efeito, sensíveis a

um espectro crescente de substâncias tóxicas, tornando estas avaliações toxicológicas ecologicamente mais precisas (LUOMA, 1996; WALKER, 1998; BURTON, 1999).

Por definição, biomarcadores são alterações bioquímicas e moleculares que indicam a exposição a determinada classe de xenobióticos (biomarcador de exposição) e/ou que indicam os efeitos dos contaminantes sobre os organismos (biomarcador de efeito) (KURELEC *et al.*, 2000). Apesar dos efeitos tóxicos serem melhor entendidos a nível celular, extrapolações quanto a influência de alterações bioquímicas sobre as populações e ecossistemas são ainda incertas e difíceis de serem analisadas. Para superar tais limitações, as alterações bioquímicas e/ou moleculares utilizadas como biomarcadores devem estar correlacionadas com outros parâmetros que reflitam modificações deletérias no organismo, como por exemplo, alterações nas taxas de alimentação e crescimento, ou na população, como modificações na reprodução, padrão de migração ou viabilidade da prole (LUOMA, 1996; NASCIMENTO *et al.*, 1998; KURELEC *et al.*, 2000).

As análises dos biomarcadores que indicam interações moleculares responsáveis pela toxicidade dos compostos e dos que medem alterações toxicocinéticas, têm adquirido crescente importância nas avaliações ecotoxicológicas, por representarem o início das modificações relacionadas ao efeito tóxico (modo de ação molecular), o que pode levar a distúrbios celulares e do organismo como um todo. A indução ou inibição de enzimas que metabolizam os xenobióticos fornecem informações sobre eventos que precedem a interação do composto químico com seu sítio de ação (LUOMA, 1996; WALKER, 1998). Tais mecanismos moleculares podem também estar envolvidos na maior ou menor sensibilidade aos xenobióticos existente entre as diferentes espécies de organismos.

## **Estratégias bioquímicas e moleculares de adaptação e resistência aos xenobióticos**

A introdução de substâncias ou compostos estranhos à composição natural da água e dos sedimentos aquáticos pode levar a profundas alterações na biota. A poluição química pode causar uma diminuição na biodiversidade dos ecossistemas, provocando a morte das espécies mais susceptíveis, enquanto outras espécies, que se mostram mais resistentes, tendem a permanecer no ambiente, dominando os nichos ecológicos desocupados e aumentando a sua densidade populacional (LUOMA, 1996; ENGLISH & KROSS, 2000; ROCHA, 2000).

Nas últimas duas décadas, alguns cientistas têm se dedicado a elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares de proteção e resistência que possibilitam aos organismos sobreviverem sob condições adversas (HUGGETT *et al.*, 1992). A exposição dos organismos a compostos tóxicos pode provocar um aumento ou uma diminuição da expressão gênica, de modo diferencial para cada composto, em função de suas características químicas e interação com os receptores celulares. Portanto, a elucidação de quais genes são expressos pelos organismos nestas situações é uma etapa fundamental para a compreensão dos mecanismos de resistência, adaptação e também do estabelecimento de patologias associadas. Avanços recentes permitiram a construção perfis de transcrição, onde são acessados os níveis de expressão de diferentes genes simultaneamente. A utilização de tais técnicas pode revolucionar a noção atual do impacto antrópico sobre os ecossistemas marinhos, elucidando mecanismos fisiológicos em seu nível molecular (JENNY *et al.*, 2002).

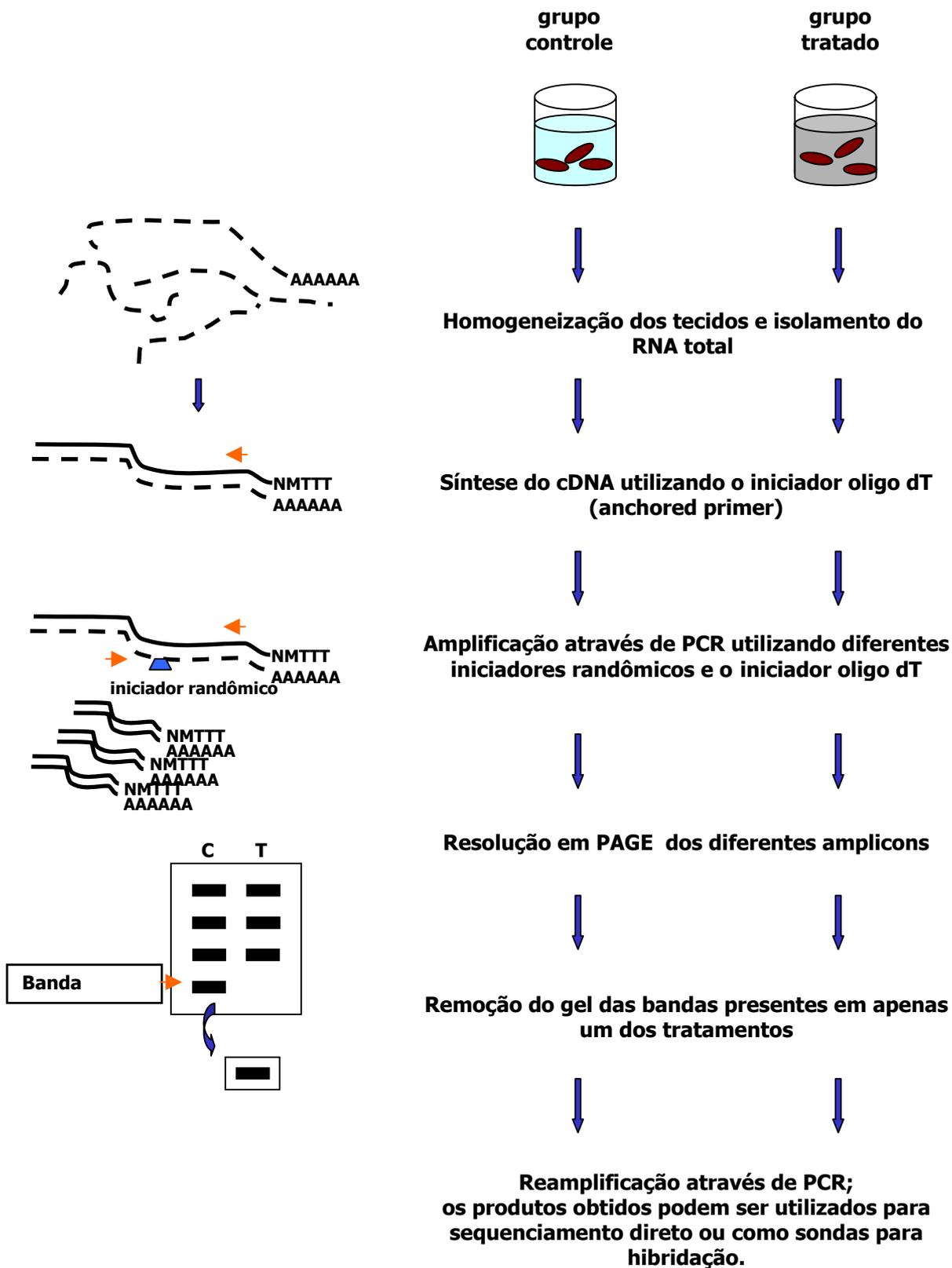
A técnica utilizada no presente estudo para acessar tais informações foi a ddPCR (*differential display polymerase chain reaction*), desenvolvida por LIANG & PARDEE (1992), a qual possibilita uma avaliação sensível de toda população de mRNAs transcritos em qualquer tipo celular ou tecido em particular, sob condições específicas em qualquer momento. Este método não depende de um conhecimento prévio da seqüência ou da abundância dos clones de cDNA, faltando, no entanto, as características quantitativas presentes nas técnicas de Northern Blotting, RNase protection ou Quantitative PCR, por exemplo

(DEBOUCK, 1995; JURECIC & BELMONT, 2000). Para a escolha da técnica, foi levada em consideração, principalmente, a necessidade de comparação de mais de duas amostras simultaneamente, em função do delineamento experimental adotado (MATZ & LUKYANOV, 1998).

Um esquema geral da técnica de ddPCR é apresentado na Figura 2. A partir de alterações dos parâmetros utilizados na geração da subpopulação de cDNA, conjuntos, representando diferentes porções da população total de transcritos, podem ser produzidos (MATZ & LUKYANOV, 1998; GREEN *et al.*, 2001).

Apesar da ddPCR ser considerada "arcaica" em comparação com as tecnologias de análise de expressão diferencial de genes mais recentes, ainda é o método mais extensivamente utilizado, principalmente, pelo fato da técnica poder ser executada em qualquer laboratório equipado com os reagentes e equipamentos padrões de Biologia Molecular. Além disso, necessita de relativamente pouco apoio na área de Bioinformática. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso, por exemplo, em estudos embriológicos, de desenvolvimento ontogenético e de patologias clínicas, principalmente aquelas relacionadas ao surgimento de neoplasias e, ainda, na avaliação da resposta dos organismos a xenobióticos (RHODES & VAN BENEDEN, 1996; SHEN & GREEN, 1998; MAHADEVA *et al.*, 1998; VAN BENEDEN, RHODES & GARDNER, 1998; GREEN *et al.*, 2001).

O capítulo IV da presente dissertação refere-se à aplicação da técnica de ddPCR em mexilhões *Perna perna*, expostos ao óleo diesel comercial. O objetivo deste estudo foi detectar alterações na expressão gênica em função da presença do óleo diesel na água, auxiliando no melhor entendimento de quais vias metabólicas estariam envolvidas nos processos de adaptação e resistência à contaminação, observados nesta espécie.



**Figura 2:** Esquema geral da técnica de ddPCR. O RNA é representado por linhas tracejadas e o mRNA poliadenilado é indicado pela cauda poli-A (**AAAAAA**). O DNA é representado por linhas contínuas. O iniciador oligo dT é indicado por **TTTTMN** (5'→ 3'), onde M é G, A ou C e N é qualquer um dos 4 nucleotídeos usuais.

Diversos estudos já foram efetuados na avaliação das estratégias utilizadas pelos organismos para se proteger da exposição aos xenobióticos orgânicos. Sabe-se que estes são facilmente absorvidos e distribuídos pelos sistemas biológicos (HODGSON & LEVI, 1994; EHC 171, 1996; NASCIMENTO *et al.*, 1998 e PORTE *et al.*, 2001). A biotransformação destes compostos é realizada por um conjunto de enzimas relativamente não específicas, que são divididas em dois grupos (HODGSON & LEVI, 1994):

- os sistemas enzimáticos da fase I, ressaltando a importância das monooxigenases de função mista, exemplificadas pelo sistema multienzimático do citocromo P450, que introduzem um grupo polar nas moléculas, aumentando a sua solubilidade e permitindo a ação do conjunto de enzimas da fase II.
- as enzimas da fase II, também chamadas de enzimas de conjugação (por exemplo a glutationa-*S*-transferase), que combinam os compostos com substratos endógenos altamente polares (glutationa, aminoácidos, grupamentos acetil, entre outros), promovendo, assim, a sua excreção.

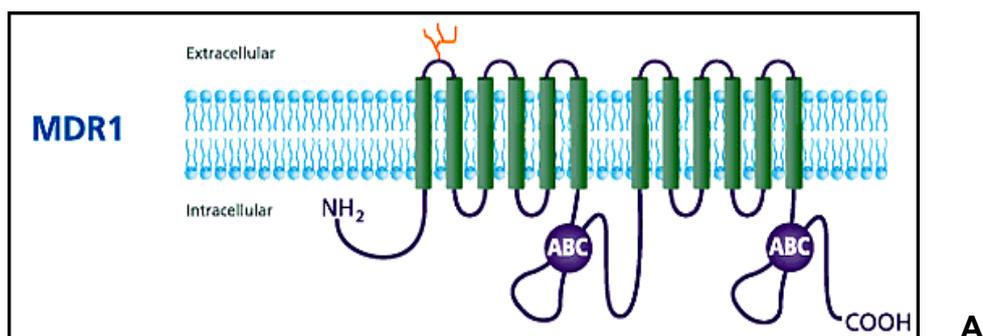
Estes sistemas bioquímicos são considerados uma linha secundária na defesa do organismo, pois eles só são ativados após a entrada do xenobiótico na célula. Recentemente, a existência de proteínas transportadoras de membrana que atuam na linha de frente da defesa celular, diminuindo o acúmulo dos xenobióticos no meio intracelular foi associada a estes sistemas de defesa. Um deles, descrito por KURELEC (1992a), foi denominado de mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR-*multixenobiotic resistance*) e parece estar diretamente relacionado à tolerância simultânea a vários compostos tóxicos lipofílicos, observada em muitas espécies de invertebrados aquáticos (SMITAL & KURELEC, 1998). O mecanismo molecular do MXR é semelhante ao observado no fenômeno de resistência a drogas múltiplas (MDR-*multidrug resistance*), descrito por ENDICOTT & LING (1989) e GOTTESMAN & PASTAN (1993) em linhagens de células tumorais de mamíferos. Estas, quando tratadas com fármacos citotóxicos durante o processo de quimioterapia, tornavam-se

refratárias, não apenas à droga utilizada, mas também a uma vasta gama de fármacos não relacionados. Este fenótipo é caracterizado pela diminuição da concentração intracelular das substâncias tóxicas, que está relacionado ao aumento da expressão de uma proteína transportadora de membrana, denominada de glicoproteína P (Pgp ou P-170) que se liga ao xenobiótico e facilita o seu efluxo, através de um sistema dependente de energia.

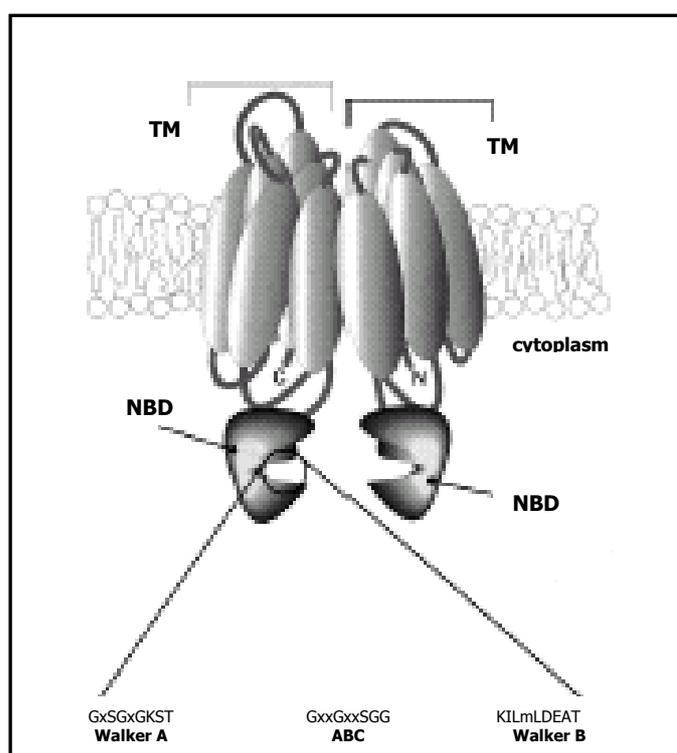
A Pgp (Figura 3) é membro da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Ela é composta por duas porções homólogas, cada uma contendo 6 domínios transmembrana e um domínio citosólico altamente conservado para ligação com nucleotídeos. Os dois domínios para ligação com nucleotídeos parecem atuar alternadamente na hidrólise do ATP, embora ambos pareçam essenciais para o funcionamento adequado do transportador, indicando que atuam de maneira cooperativa (HUNG *et al.*, 1998; AMBUDKAR *et al.*, 1999; SHAROM *et al.*, 1999; BARD, 2000; BORST & OUDE ELFERINK, 2002). A Pgp é um transportador movido por ATP que, mesmo na ausência de substratos, apresenta uma atividade de ATPase constitutiva (basal). Esta atividade basal pode ser estimulada (induzida) pela presença de fármacos que sejam substrato para o transporte. Normalmente a interação com os fármacos obedece um padrão bi-modal de atividade: em concentrações mais baixas, a atividade do transportador aumenta, sendo inibida em concentrações mais altas (AMBUDKAR *et al.*, 1999; SHAROM *et al.*, 1999).

O modelo para o funcionamento da Pgp mais aceito atualmente é a soma de elementos do modelo denominado de *hydrophobic vacuum cleaner* e do modelo de *flippase* (HIGGINS, 1992; BARD, 2000; JOHNSTONE, RUEFLI & SMYTH, 2000; BORST & OUDE ELFERINK, 2002) (Figura 4).

Alguns autores propõem que a ativação do transporte via Pgp faça parte de uma resposta generalizada ao estresse. EUFEMIA & EPEL (2000) observaram que mexilhões da espécie *Mytilus californianus* mostravam uma indução do MXR quando na presença de compostos que não são substratos para o transporte, e em função de alterações na temperatura. Os autores sugeriram que, como as HSPs, a indução da Pgp seja um dos mecanismos ativados para a proteção celular em resposta a situações estressantes.

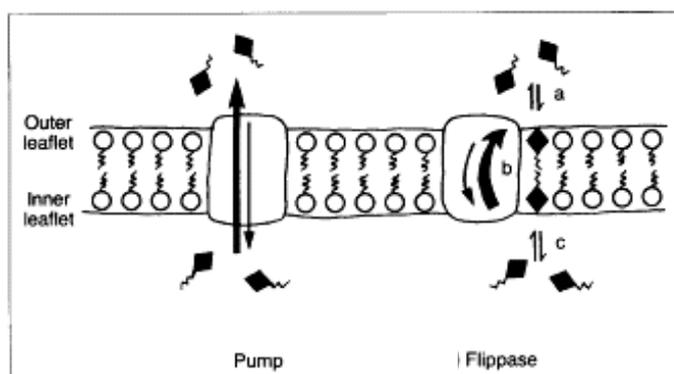


A

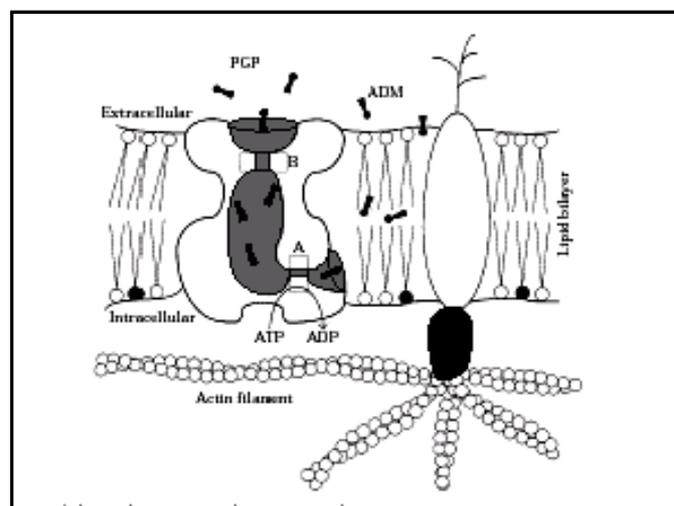


B

**Figura 3:** Modelos da estrutura dos transportadores ABC. Em (A), representação bidimensional do MDR1 de humanos. Em (B), representação tridimensional do modelo estrutural padrão da família ABC (Bolhuis *et al.*, 1997). Possuem dois domínios transmembrana homólogos (indicados como TDM em B), contendo 6 segmentos  $\alpha$  - hélice (representados em verde em A e como elipses em B). Os domínios para ligação de nucleotídeos (indicados como ABC em A e como NBD em B) localizam-se na face citoplasmática da membrana e contêm uma região altamente conservada (*ABC signature*) e os motivos Walker A e Walker B, envolvidos na hidrólise de ATP. Na figura B, os nucleotídeos mais conservados destes motivos estão indicados.



A



B

**Figura 4:** Diferentes modelos propostos para o transporte de substratos pela Pgp. Em (A), modelos discutidos por Higgins & Gottesman (1992), a Pgp atuaria como uma bomba (pump), sem a interação do substrato com a bicamada lipídica, ou como uma flipase, com o substrato interagindo primeiro com a bicamada e só então se mostrando acessível ao transportador. ♦ representa os substratos. Em (B), modelo de “hydrophobic vacuum cleaner” discutido por Ashida, Oonishi & Uyesaka (1998), o substrato interage com o transportador enquanto está inserido no interior da bicamada lipídica, antes mesmo de alcançar o citosol. As setas representam os substratos, A indica a bomba ATP – dependente (que pode ser bloqueada por vanadato) e B, indica o mecanismo de válvula que é suprimido pelo verapamil.

As proteínas transportadoras relacionadas a Pgp são codificadas por genes altamente conservados, pertencentes à família *mdr* (SCHIENGOLD *et al.*, 2001). Estes genes são filogeneticamente conservados e já foram identificados em diversos organismos (BARD, 2000; SCHIENGOLD *et al.*, 2001), dentre eles: arqueobactérias, bactérias, leveduras, protozoários (*Plasmodium* e *Leishmania*), insetos (*Drosophila*), vegetais (*Arabidopsis thaliana*); diferentes invertebrados, dentre eles mexilhões das espécies *Mytilus edulis*, *Mytilus californianus*, *Mytilus galloprovincialis* e *Perna perna* (GALGANI *et al.*, 1995; CORNWALL *et al.*, 1995; KURELEC, KRÈA & LUCIÆ, 1996; GRIMM *et al.*, 2000; GRIMM, 2001), nematóides e poliquetas. A Pgp também está presente em peixes, aves, mamíferos (BRADLEY, GEORGES & LING, 1990; BORST *et al.*, 1993; BARD, 2000) e em humanos (GOTTESMAN & PASTAN, 1993).

A ampla distribuição entre os taxa sugere que o fenótipo possua uma função biológica genérica. Em condições normais (ausência de exposição a xenobióticos), a expressão da Pgp em humanos parece estar confinada às membranas apicais dos tecidos secretores (fígado, pâncreas, adrenal e útero durante a gravidez), de absorção (intestino, pulmões e rins) e que formam barreiras (barreira placentária e barreira hemato-encefálica), sugerindo como sua função fisiológica a proteção/excreção de produtos tóxicos naturalmente presentes na dieta, de metabólitos endógenos ou na secreção de cortisol, aldosterona e outros esteróides (DEBRY *et al.*, 1997; AMBUDKAR *et al.*, 1999; BARD, 2000; JOHNSTONE, RUEFLI & SMYTH, 2000; OUDE ELFERINK & ZADINA, 2001; BORST & OUDE ELFERINK, 2002). Como já visto, em situações de exposição a agentes tóxicos exógenos, este sistema também é ativado, indicando que durante o curso da evolução o sistema MDR/MXR desenvolveu-se como um mecanismo de defesa pouco específico para proteção do organismo, tanto de agressões endógenas quanto exógenas (KURELEC, 1992; KURELEC, 1997; SMITAL & KURELEC, 1998a; KURELEC *et al.*, 1998; EPEL, 1998; EUFEMIA & EPEL, 2000; BARD, 2000; SCHIENGOLD *et al.*, 2001; BORST & OUDE ELFERINK, 2002).

Alguns genes codificadores da Pgp já foram clonados e sua amplificação e superexpressão mostraram-se diretamente proporcionais ao grau de resistência

observado em linhagens celulares que apresentam o fenótipo MDR (ENDICOTT & LING, 1989; AMBUDKAR *et al.*, 1999; BARD, 2000; SHIENGOLD *et al.*, 2001; BORST & OUDE ELFERINK, 2002; LÜDERKING & KÖHLER, 2002). A expressão do fenótipo MDR/MXR é normalmente estudada utilizando-se o anticorpo monoclonal C219, o qual reconhece uma seqüência interna extremamente conservada presente em todas as proteínas transportadoras relacionadas a Pgp até hoje estudadas (MINIER & GALGANI, 1995; MINIER *et al.*, 2000; STURN, CRAVEDI & SEGNER, 2001).

Além disso, a função de transporte da proteína é modulada por modificações pós-traducionais, através da fosforilação mediada pela proteína quinase C (PKC), sendo que seus ativadores, como forbol 12-miristato 13-acetato, ou seus inibidores, como a estaurosporina, estimulam ou inibem o efluxo das drogas para o meio extracelular, respectivamente (SMITAL & KURELEC, 1998).

A presença da Pgp já foi confirmada através de métodos bioquímicos (*binding*) (KURELEC & PIVČEVIĆ, 1989), moleculares (imunohistoquímica, *Western* e *Northern blots*) (KURELEC *et al.*, 1992; TOOMEY & EPEL, 1993; MINIER, AKCHA & GALGANI, 1993; CORNWALL *et al.*, 1995), fisiológicos (sensibilidade ao verapamil) (KURELEC & PIVČEVIĆ, 1991; GALGANI *et al.*, 1995; MINIER & MOORE, 1996) e toxicológicos (modulação da toxicidade) (WALDMANN *et al.*, 1995; SMITAL & KURELEC, 1998).

Alguns fármacos, como o verapamil, são substratos com alta afinidade pela Pgp, sendo por ela transportados e causando, por competição, a inibição do efluxo de compostos que possuam menor afinidade. Se tais compostos forem citotóxicos, a sensibilidade prévia é restaurada (KURELEC, 1997; SHAROM *et al.*, 1999; KURELEC, *et al.* 2000). Vários compostos foram testados quanto a sua capacidade de reverter o quadro MDR *in vitro*, durante a busca por tratamentos quimioterápicos mais eficientes. Alguns deles são compostos lipofílicos não tóxicos (naturais ou manufaturados pelo homem) que são reconhecidos pela Pgp e que em altas concentrações podem saturar o sistema e reverter o efluxo dos compostos tóxicos. Outros são conhecidos por alterar a regulação deste mecanismo, como os ativadores ou inibidores da PKC (SIKIC *et al.*, 1997; SHARON *et al.*, 1999; BARD, 2000; BORST & OUDE ELFERINK, 2002). Esta nova

classe de compostos, conhecida como quimiosensibilizadores, tem sido alvo de estudos ecotoxicológicos, em função do possível risco ambiental que representam, pois bloqueiam o mecanismo celular básico de defesa e reverterem a resistência natural apresentada pelos organismos (KURELEC, 1997; KURELEC, PIVCEVIC & SMITAL, 1998; SMITAL & KURELEC, 1998; KURELEC *et al.*, 2000; EUFEMIA & EPEL, 2000).

Atualmente, a estratégia utilizada para se estudar o impacto destes quimiosensibilizadores sobre os sistemas de defesa celular relacionados ao MXR, envolve estudos de acúmulo/efluxo utilizando sondas moleculares, normalmente substratos fluorescentes, como a H<sup>3</sup>-vincristina, a calceína acetoxi metil éster (calceína AM), a rodamina 123 e a rodamina B, que atuam como substratos para o transporte via Pgp. Nestes estudos, os organismos (ou porções de tecidos destes) são incubados com o substrato modelo, na presença ou na ausência do xenobiótico que se pretende testar. O acúmulo do substrato fluorescente no meio intracelular é inversamente proporcional à atividade do MXR. Estes ensaios permitem a quantificação da atividade desta proteína em situações diversas, utilizando diferentes tecidos ou mesmo organismos inteiros (SMITAL & KURELEC, 1998; BRITVIC & KURELEC, 1999; KURELEC *et al.*, 2000; EUFEMIA & EPEL, 2000; BARD & STEGEMAN, 2002; HAUMDOUM, GRIFFIN & CHERR, 2002).

A observação do bloqueio do transporte da Pgp pela presença de quimiosensibilizadores em experimentos *in vivo* e a relação entre esta diminuição na eficiência e o aumento dos efeitos tóxicos de xenobióticos presentes no meio, confirmou o que já havia sido observado *in vitro* e mostrou a importância ecológica dos quimiosensibilizadores (KURELEC, 1997; KURELEC *et al.*, 1998; SMITAL & KURELEC, 1998; BRITVIC & KURELEC, 1999; KURELEC *et al.*, 2000; BARD & STEGEMAN, 2002; HAUMDOUM, GRIFFIN & CHERR, 2002). Considerando-se que compostos anteriormente considerados não tóxicos podem inibir o sistema MXR, surgem alguns questionamentos sobre a magnitude e reversibilidade destes efeitos. As implicações nos estudos ecotoxicológicos e na avaliação da qualidade ambiental podem ser bastante profundas (SMITAL & KURELEC, 1998; KURELEC *et al.*, 2000; STURN, CRAVEDI & SEGNER, 2001).

O capítulo I da dissertação trata da análise de alguns biomarcadores (atividade e expressão da Pgp, expressão das HSP 60 e HSP 70 e atividade da GST) em *Perna perna*, após a realização de um experimento para avaliação da influência da liberação de esgoto doméstico sem tratamento, na Baía Norte, Ilha de Santa Catarina – SC. No capítulo II, a influência do óleo diesel sobre a expressão e atividade da Pgp foi analisada nos mexilhões *P. perna*, provenientes da zona de cultivo localizada na Praia do Sambaqui. E finalmente, no capítulo III, o trabalho trata das diferenças existentes na indução do MXR em *P. perna*, provenientes de diferentes localidades da Ilha de Santa Catarina – SC.

### **Mexilhões: relevância sócio-econômica e em estudos de avaliação ambiental**

Os mexilhões e outros bivalves são adequados para o monitoramento da poluição aquática por serem organismos que se alimentam através de filtração, mantendo contato quase que constante com o meio circundante; serem sésseis, não podendo se deslocar, caso, as condições do ambiente se tornem adversas; serem de fácil manuseio; ocorrerem o ano inteiro e possuírem uma boa tolerância a várias classes de xenobióticos, em comparação com peixes e crustáceos, sobrevivendo em condições ambientais adversas (SHEEHAN & POWER, 1999; BARRACO, MEDEIROS & MOREIRA, 1999; PORTE *et al.*, 2001). Além disso, esses organismos apresentam importância sócio-econômica crescente (MARQUES, PEREIRA & CORREA, 1998).

O cultivo de mexilhões em Santa Catarina, utilizando a espécie nativa *Perna perna*, começou em 1989. Esta atividade econômica tem crescido exponencialmente, tendo a produção total de 190 toneladas/ano em 1990 alcançado 7500 toneladas/ano em 1997 (BAINY *et al.*, 2000). Em 1999, 9400 toneladas de mexilhões foram produzidas, sendo um crescimento de aproximadamente 20%, projetado para os anos de 2000-2001 (DA SILVA, MAGALHÃES & BARRACO, 2002). Nos últimos anos, o Estado de Santa Catarina estabeleceu-se como o maior produtor de mexilhões de cultivo do Brasil, 13500

toneladas em 2002 (PESSATI, M., comunicação pessoal, 2003). Possui também um dos maiores estoques naturais de bivalves de interesse comercial (principalmente ostras e mexilhões) de nosso país, o qual tem sido continuamente explorado pela população local.

Problemas ambientais (causados principalmente pela mineração do carvão, efluentes das indústrias têxteis e dejetos urbanos) têm sido observados ao longo da costa, particularmente nas regiões estuarinas, o que pode afetar tanto as populações de mexilhões selvagens como as cultivadas, comprometendo, assim, a saúde destes organismos e podendo influenciar a qualidade destes para o consumo humano (CNIO, 1998; SILVA, MAGALHÃES & BARRACO, 2002).

### **Aspectos biológicos de *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)**

Posicionamento sistemático da espécie (RIOS, 1994):

Reino: METAZOA	
Filo: MOLLUSCA	
Classe: PELECYPODA	LINNAEUS, 1758
Ordem: MYTILOIDA	FÉRRUSAC, 1822
Superfamília: MYTILOIDEA	RAFINESQUE, 1815
Família: MYTILIDAE	RAFINESQUE, 1815
Subfamília: MYTILINAE	RAFINESQUE, 1815
Gênero: <i>Perna</i>	RETZIUS, 1788
Espécie: <i>Perna perna</i>	LINNAEUS, 1758

O padrão de distribuição natural da espécie envolve a Costa Atlântica da América do Sul (da Venezuela ao Uruguai), as Costas Europeias do Mediterrâneo Espanhol (na região de Málaga) e no continente Africano, a Costa do Mediterrâneo Ocidental (de Gibraltar ao Cabo Horn), a Costa Atlântica (Mauritânia, Marrocos, África do Sul e Angola) e a Costa Índica da África do Sul (MOREIRA, 1995). O *Perna perna* distribui-se ao longo de toda a Costa Brasileira, principalmente entre o litoral do Espírito Santo e Santa Catarina (RIOS, 1994; DA SILVA, MAGALHÃES & BARRACO, 2002).

A característica diagnóstica mais evidente na espécie é a presença, na porção interna da concha, de uma divisão na cicatriz do músculo adutor

posterior. Externamente, este bivalve pode ser facilmente reconhecido através da coloração marrom de suas valvas (Figura 5A) (SCHURINK & GRIFFITHS, 1990).

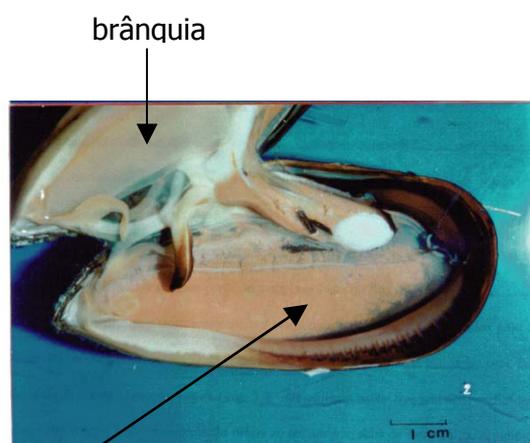
A reprodução é sexuada com fecundação externa, sendo os gametas liberados diretamente na coluna d'água durante o período reprodutivo. Não apresentam dimorfismo sexual externo, com machos e fêmeas sendo diferenciados internamente através da coloração das gônadas (Figura 5B) (LASIAK, 1986). Logo após a fertilização (cerca de 8 horas), a forma larval originada é denominada de trocófora, formando-se em seguida a larva típica dos moluscos, denominada de véliger. Ao final da fase planctônica, inicia-se a procura por um substrato para fixação e a formação das estruturas do bisso (MAGALHÃES, COMUNICAÇÃO PESSOAL, 2001). Segundo SCHURINK & GRIFFITHS (1991), o período de reprodução estende-se de abril a setembro. Acredita-se que a liberação dos gametas seja ativada pela queda na temperatura da água em decorrência do surgimento de correntes ascendentes durante o inverno (CARVAJAL, 1969).

A espécie apresenta um crescimento contínuo, mesmo após alcançar a maturidade sexual, a qual ocorre quando os animais atingem 20 mm de comprimento da concha (MAGALHÃES, 1985). O comprimento máximo que a concha pode apresentar é influenciado pela distribuição vertical dos animais. Nas zonas interditais, os mexilhões alcançam 90 mm. No entanto, um comprimento máximo de até 120 mm pode ser observado em indivíduos que habitam as zonas sublitorâneas (SCHURINK & GRIFFITHS, 1990).

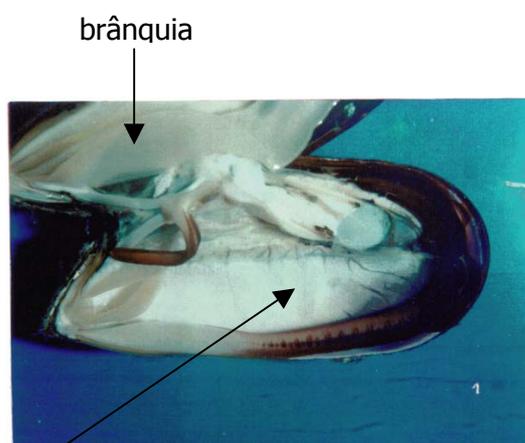
O hábito alimentar da espécie é a filtração, através da vibração dos cílios branquiais (BARNES, 1984). Os mexilhões conseguem regular a taxa de ventilação, de maneira a controlar a quantidade de oxigênio necessário para a manutenção das suas funções vitais, que é em geral de 1 a 4 litros/hora (MOREIRA, 1995). Este bivalve é eurihalino, osmoconformador, tolerando uma variação na salinidade entre 19 a 44 (SALOMÃO, MAGALHÃES & LUNETTA, 1980; STUCCHI-ZUCCHI & SALOMÃO, 2003). São considerados euritérmicos, suportando variações de 5 a 30° C, com uma faixa ótima de temperatura entre 21 e 28°C (EPAGRI & UFSC, 1994).



A



Fêmea



Macho

B

**Figura 5:** *Perna perna*. Em (A) morfologia externa da espécie. Em (B), morfologia interna da espécie, as setas indicam a localização das brânquias e o padrão distinto de coloração do tecido gonadal, apresentado por fêmeas e machos.

Fotos: Jaime F. Ferreira

## **Capítulo 1**

**Resposta de biomarcadores no mexilhão, *Perna perna*, transferido para um local contaminado na Ilha de Santa Catarina, Brasil**

Lemos, P.M.M.<sup>1</sup>, Trivella, D.B.B.<sup>1</sup>, Bresolin, T.<sup>1</sup>, Xavier, A.L.R.<sup>1</sup>, Zanette, J.<sup>1</sup>, Ferreira, J.F.<sup>2</sup>, Bainy, A.C.D.<sup>1</sup>, Marques, M.R.F.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, CCB; <sup>2</sup>Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, Departamento de Aqüicultura, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

\*Autor para correspondência: FAX + 55 48 331 9672. e-mail address:

**risomar@mbox1.ufsc.br**

#### RESUMO

*Organismos aquáticos são capazes de sobreviver em locais contaminados, o que sugere a existência, nestes animais, de meios para tolerar a mistura de vários xenobióticos, incluindo a indução das proteínas de choque térmico (Hsps), aumento da atividade da*

*glutathione-S-transferase (GST) e a ativação do mecanismo de resistência múltipla a xenobióticos (MXR-multixenobiotic resistance). O objetivo do presente estudo foi a avaliação destes biomarcadores na brânquia dos mexilhões *Perna perna* transferidos de uma zona de cultivo (Sambaqui-SM) para um local contaminado com esgoto doméstico (Baía Norte-BN) na Ilha de Santa Catarina, Brasil. A concentração da Pgp não foi significativamente diferente, entretanto sua atividade aumentou após 14 dias nos animais mantidos na BN. Foram observados maiores níveis de Hsp60 nos mexilhões mantidos em SM durante 7 dias. A expressão da Hsp70 aumentou em ambos os locais após 14 dias. Uma diminuição na atividade da GST foi observada em BN após 24 horas de exposição. A inibição da atividade da Pgp não ocasionou mudanças nos outros biomarcadores, indicando que esta espécie tolera os xenobióticos presentes no esgoto doméstico.*

*Palavras-chave:* Biomarcadores, efeitos bioquímicos, *Perna perna*, Mexilhão, Pgp, MXR, HSP, GST

A sobrevivência dos organismos aquáticos em locais contaminados depende de diferentes adaptações moleculares que os tornam capazes de tolerar a presença dos xenobióticos (Eufemia & Epel 2000; Bard 2000). A glutationa-S-transferase (GST) engloba uma superfamília altamente conservada de enzimas de fase II, envolvidas no metabolismo de xenobióticos (Gallagher, Sheedy, Lame & Segall 2000). A glicoproteína-P (Pgp) é um transportador transmembrana que bombeia xenobióticos para fora da célula, prevenindo o seu acúmulo e os efeitos tóxicos associados, caracterizando o mecanismo de resistência múltipla a xenobióticos (MXR) (Smital & Kurelec, 1998). As proteínas de estresse (Hsps) estão envolvidas na proteção celular contra efeitos proteotóxicos, particularmente os causados pelos xenobióticos (Sanders & Martin, 1993). As Hsps participam na recuperação de proteínas danificadas através do redobramento como Chaperoninas (Feder & Hofmann, 1999).

O objetivo do presente estudo foi a avaliação destes biomarcadores na brânquia de *Perna perna* coletados na zona de cultivo (Sambaqui-SM, local referência) e transferidos para um local considerado contaminado por esgoto doméstico (Baía Norte-BN, local contaminado) na Ilha de Santa Catarina, região sul do Brasil.

Os mexilhões foram mantidos em SM e BN durante 1 ( $T_1$ ), 7 ( $T_7$ ) e 14 dias ( $T_{14}$ ) ( $n=7$  para cada grupo). Um grupo de animais de SM foi amostrado antes da transferência ( $T_0$ ). A atividade da Pgp foi determinada pela razão entre o acúmulo *in vivo* de Rodamina B (ROD) nos mexilhões na presença e ausência de verapamil (VER), um inibidor da atividade da Pgp (Kurelec et al., 2000). A expressão da Pgp foi analisada de acordo com o protocolo adaptado de Eufemia & Epel (2000), utilizando o anticorpo monoclonal C219 (Signet). Anticorpos policlonais anti-Hsp70 e monoclonais anti-Hsp60 (Calbiochem) foram utilizados para a detecção das Hsp. O complexo imune foi detectado por eletroquimioluminescência e as bandas protéicas foram quantificadas

utilizando-se o programa Scion Image. A atividade da GST foi determinada segundo Keen et al. (1976), utilizando 1-cloro, 2-4 dinitrobenzeno. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de ANOVA de uma via. Uma matriz de correlação entre as médias dos dados biológicos e os parâmetros ambientais foi realizada utilizando-se Statsoft 1998. O nível de significância adotado foi 0,05.

A expressão da Hsp60 aumentou nos mexilhões que foram mantidos em SM em T<sub>7</sub> (Fig. 1A). Mexilhões de ambos os locais mostraram um aumento tempo-dependente nos níveis de Hsp70, sendo significativamente diferente em T<sub>14</sub> (Fig. 1B).

Nenhuma alteração na expressão da Pgp foi observada nas brânquias dos mexilhões mantidos, tanto no local referência quanto no local contaminado (Fig. 1C). Mexilhões dos grupos T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> mostraram uma menor atividade da Pgp, que pode estar relacionada com os níveis mais altos de turbidez e clorofila *a* existentes em SM, nestes períodos (Tabela 1). A influência destes parâmetros na atividade da Pgp foi anteriormente observada em *Dreissena polymorpha* (Kurelec, Britvić, Pivčević & Smital, 1998). Por outro lado, os mexilhões mantidos na BN após 14 dias da transferência mostraram uma atividade da Pgp 4,9 vezes maior que o grupo referência. A Hsp70 e a Pgp parecem não agir sempre em conjunto na resposta ao stress em mexilhões (Eufemia & Epel, 2000). Este parece ser o caso no presente trabalho, já que o padrão observado para os dois biomarcadores, não foi o mesmo nos mexilhões que permaneceram em BN.

A atividade da GST foi significativamente menor nos mexilhões que permaneceram por 1 dia na BN, comparando-se com o grupo referência. Todavia, este efeito não foi observado após 7 e 14 dias. Tal comportamento pode ser consequência de uma resposta adaptativa de curto-prazo a este ambiente. Estudos anteriores realizados com mexilhões mantidos no mesmo local, durante seis meses, mostraram um aumento

significativo na atividade da GST. Esta resposta bioquímica foi atribuída a uma maior carga de contaminantes associada a um elevado índice pluviométrico (Bainy, Almeida, Müller, Ventura & Medeiros, 2000). Todavia, não foram registradas chuvas durante o presente experimento, o que pode explicar em parte os dados sobre a atividade da GST.

Nossos resultados mostram que a liberação de esgoto doméstico em BN promove um aumento na atividade da Pgp nas brânquias de *P. Perna*, depois de 14 dias. Nenhuma outra alteração foi observada nas outras respostas bioquímicas, indicando que esta espécie tolera os xenobióticos presentes no esgoto doméstico.

#### *Agradecimentos*

Nós gostaríamos de agradecer ao CNPq pelo suporte financeiro (Proc. 520741/99.4; Proc. 470695/01-3). T. Bresolin, A.L.R. Xavier, D.B.B.Trivella and J. Zanette possuem bolsas do CNPq para estudantes de graduação (PIBIC). P.M.M. Lemos possui bolsa da CAPES para estudantes graduados.

*References*

- Bainy, A. C. D., Almeida, E. A., Müller, I. C., Ventura, E. C., & Medeiros, I. D. (2000). *Marine Environmental Research*, 50, 113-118.
- Bard, S. M. (2000). *Aquatic Toxicology*, 48, 357-389.
- Eufemia, N. & Epel, D. (2000). *Aquatic Toxicology*, 49, 89-100.
- Feder, M. E. & Hofmann, G. E. *Annual Review Physiology*, 61, 242-282, 1999.
- Gallagher, E., Sheedy, K. M., Lame, M. W. & Segall, H. J. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (2), 319-326, 2000.
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). *Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183-6188.
- Kurelec, B., Britvić, S., Pivčević, B. & Smital, T. (1998). *Marine Environmental Research*, 46, 415-419.
- Kurelec, B., Smital, T., Pivčević, B., Eufemia, N. & Epel, D. (2000). *Ecotoxicology*, 9, 307-327.
- Sanders, B. M. & Martin, L. S. (1993). *The Science of the Total Environment*, 139/140, 459-470.
- Smital, T., & Kurelec, B. (1998). *Mutation Research*, 399, 43-53.

Legenda das figuras:

Figura 1. Expressão da Heat shock protein 60 (Hsp60) (A), da Heat shock protein 70 (Hsp70) (B) e da Glicoproteína-P (Pgp) (C); atividade da Pgp (D) e da Glutathione S-transferase (GST) (E) nas brânquias do mexilhão *Perna perna* mantidos no local referência (Sambaqui-SM) e no local contaminado (Baía Norte-BN) durante 0, 1, 7 e 14 dias. \* Indica diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) através de ANOVA. Dados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão.

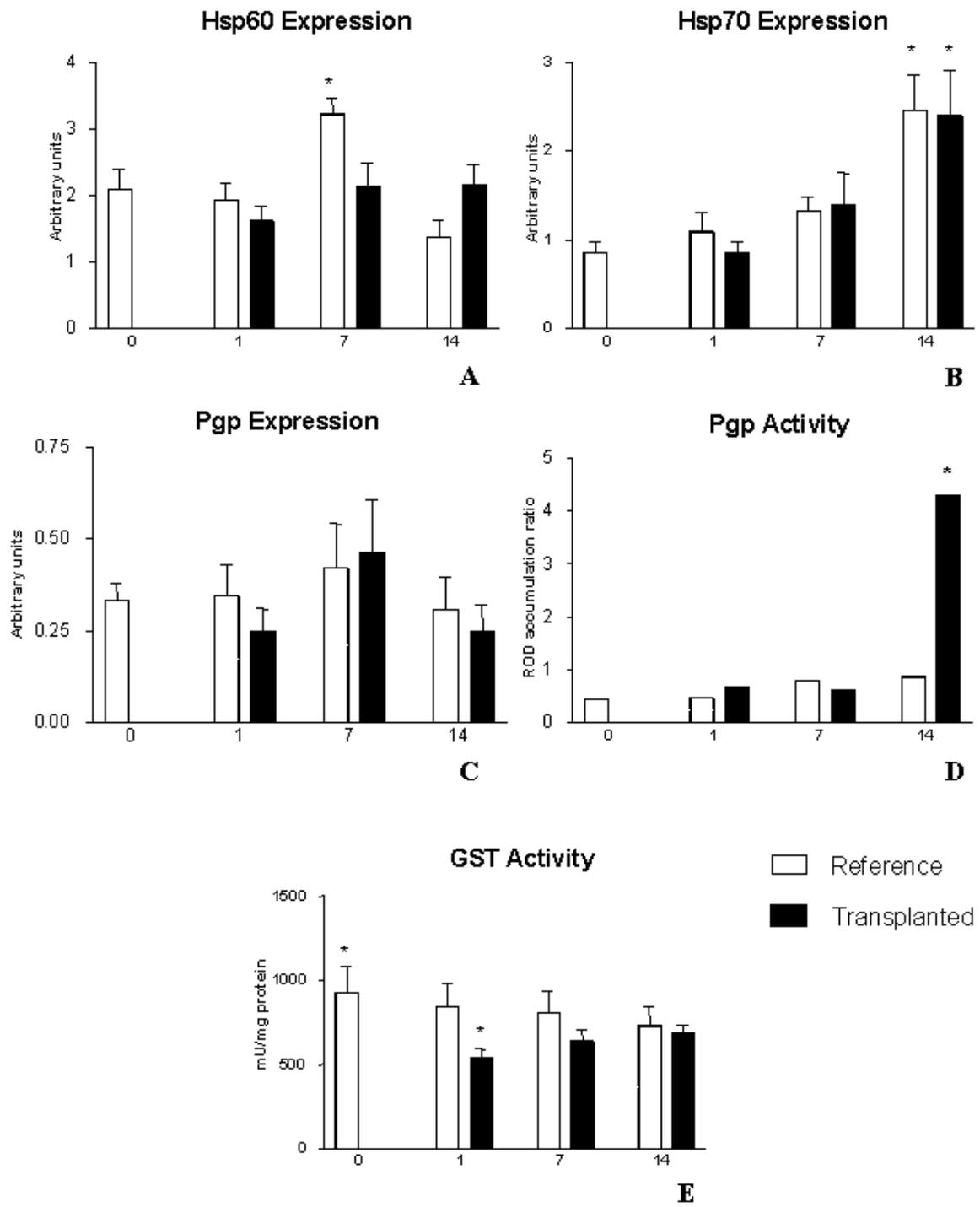


Tabela 1

Correlação entre as médias dos dados biológicos (biomarcadores) e os parâmetros ambientais.

	Pgp Act.	Pgp Exp.	GST Act.	Hsp60	Hsp70	T°C	pH	Salinity	Turbidity	TPM	PIM	POM	Chl A	Pheo
Pgp Act.	1,000													
Pgp Exp.	0,163	1,000												
GST Act.	-0,975	0,058	1,000											
Hsp60	-0,067	0,973	0,285	1,000										
Hsp70	0,848	-0,384	-0,944	-0,585	1,000									
T°C	0,961	0,429	-0,877	0,210	0,669	1,000								
pH	-0,653	0,640	0,804	0,799	-0,955	-0,419	1,000							
Salinity	0,653	-0,640	-0,804	-0,799	0,955	0,419	<b>-1,000</b>	1,000						
Turbidity	<b>-1,000</b>	-0,182	0,971	0,047	-0,838	-0,967	0,638	-0,638	1,000					
TPM	0,342	-0,871	-0,541	-0,960	0,788	0,070	-0,935	0,935	-0,324	1,000				
PIM	0,285	-0,899	-0,490	-0,975	0,750	0,010	-0,912	0,912	-0,267	<b>0,998</b>	1,000			
POM	0,521	-0,757	-0,696	-0,887	0,894	0,265	-0,987	0,987	-0,504	0,980	0,967	1,000		
Chl A	-0,945	-0,476	0,850	-0,262	-0,629	<b>-0,999</b>	0,370	-0,370	0,951	-0,017	0,043	-0,213	1,000	
Pheo	-0,949	-0,465	0,857	-0,250	-0,639	<b>-0,999</b>	0,382	-0,382	0,955	-0,030	0,030	-0,226	<b>1,000</b>	1,000

Biomarcadores: atividade da Pgp, expressão da Pgp, atividade da GST, expressão da Hsp60, expressão da Hsp70.

Parâmetros ambientais: Temperatura, pH, Salinidade, Turbidez, Matéria particulada total (TPM), Matéria inorgânica particulada (PIM), Matéria orgânica particulada (POM), Clorofila A (Chl A), Pigmentos de Pheophyta (Pheo).

Correlações em negrito indicam significância estatística ( $P \leq 0.05$ ).

## Capítulo 2

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO MXR EM MEXILHÕES *PERNA PERNA*  
EXPOSTOS AO ÓLEO DIESEL**

Priscilla M. M. Lemos\*, Daniela B. B. Trivella, Taise Bresolin, Eliana C. Ventura,  
Maria Risoleta F. Marques & Afonso C.D. Bainy

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica,  
Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina,  
Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil

\*Tel 55-48-3316561, Fax 55-48-3319672, e-mail [lemosfish@bol.com.br](mailto:lemosfish@bol.com.br)

## Resumo

*Neste estudo foram avaliados os efeitos da exposição ao óleo diesel comercial sobre o mecanismo de resistência múltipla a xenobióticos (MXR) em mexilhões *Perna perna* (L.). O mecanismo MXR está relacionado com a expressão de um transportador, a glicoproteína-P (Pgp), que bombeia xenobióticos para fora da célula, com gasto de energia, prevenindo, assim, o seu acúmulo e os efeitos tóxicos associados. A atividade da Pgp pode ser medida *in vivo*, através de ensaios de acúmulo/efluxo de rodamina (ROD), a partir de comparações entre o acúmulo intracelular de ROD (1,5  $\mu\text{M}$ ), na presença e ausência do inibidor competitivo verapamil (VER = 20  $\mu\text{M}$ ). Diferentes condições de ensaio foram utilizadas, de modo a testar vários aspectos da interação Pgp/óleo diesel. A presença de uma proteína de 170 kDa foi identificada no tecido branquial de *Perna perna*, através de Western blotting. Nenhuma diferença nos níveis da Pgp foi observada após a exposição ao óleo diesel (1 – 24h) em laboratório ou após a exposição *in situ* a esgoto doméstico (1 – 14 dias). No entanto, foram detectadas alterações na atividade da Pgp. Em alguns ensaios, a capacidade de transporte da Pgp pareceu estar saturada. Foi estabelecida uma correlação positiva entre a turbidez da água e a saturação da Pgp. O óleo diesel dificulta o efluxo da ROD e aparentemente não interfere na sua captação. Os resultados obtidos indicam que a resistência a contaminação observada em mexilhões *P. perna* pode ser relacionada, pelo menos parcialmente, com a indução do mecanismo MXR.*

**Palavras chave:** MXR, Pgp, *Perna perna*, mexilhão, óleo diesel, esgoto doméstico

### Abstract

*The aim of this study was to evaluate the effects of diesel oil exposure upon the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in mussel Perna perna (L.). MXR mechanism is associated to the expression of a transporter, P-glycoprotein (Pgp,) that pumps xenobiotics out of the cell, in an energy dependent manner, preventing their accumulation and associated toxic effects. Pgp activity can be measured in vivo by rhodamine (ROD) accumulation/efflux assays, that basically consist in comparisons between intracellular accumulation of ROD (1,5  $\mu$ M) either in the presence or absence of the competitive inhibitor verapamil (VER = 20  $\mu$ M). Different conditions were adopted for the assays in order to test various aspects of Pgp/diesel oil interactions. Western blot analysis confirmed the presence of Pgp-like proteins in P. perna gill tissue. No differences in Pgp expression were observed neither after oil exposure (1 – 24h) in the laboratory nor after in situ exposure to domestic sewage (1 – 14 days). In some assays, the Pgp transport capacity seemed to be saturated. A positive correlation was established between the water turbidity and Pgp saturation. Diesel oil makes the efflux of ROD difficult and apparently does not interfere with its uptake. These results indicate that the resistance to contamination observed in P. perna can be related, at least partially, to the induction of the MXR mechanism.*

## Introdução

O nível de contaminantes ao longo da costa brasileira tem aumentado constantemente devido a elevada densidade populacional na zona costeira. Estima-se que mais da metade da população brasileira viva atualmente a menos de 200 Km do oceano Atlântico (Brasil MMA - Ministério do Meio Ambiente 1996).

Alguns organismos aquáticos são capazes de sobreviver em locais altamente contaminados, o que sugere que eles possuam estratégias para resistir ou tolerar a presença de misturas complexas de xenobióticos (Bard 2000, Eufemia & Epel 2000). Uma resposta geral à exposição a compostos tóxicos é a indução do mecanismo de resistência múltipla a xenobióticos (MXR), primeiramente descrito em organismos aquáticos por Kurelec (1992). Esse fenômeno é comumente associado a super-expressão de uma proteína transmembrana de 170 kDa, a glicoproteína-P (Pgp), que bombeia substratos tóxicos para fora da célula, com gasto de energia, prevenindo assim, o acúmulo dos mesmos e os efeitos tóxicos relacionados (Bard 2000, Kurelec et al. 2000).

Proteínas *Pgp-like* têm sido descritas em diversos taxa, incluindo bactérias, invertebrados, vertebrados e plantas (Smital & Kurelec 1998, Bard 2000). Essa distribuição filogenética ampla pode significar que, ao longo do processo evolutivo, o transporte mediado pela Pgp possa ter se tornado um mecanismos biológico geral de defesa/proteção contra toxinas endógenas ou de origem ambiental (Smital & Kurelec 1998a, Schiengold et al. 2001).

Segundo Smital & Kurelec (1998b) e Bard (2000), a indução do MXR em populações naturais de organismos aquáticos é diretamente proporcional ao nível de poluição observado no ambiente. A atividade da Pgp pode ser medida *in vivo*, através de ensaios de acúmulo de rodamina B (ROD), sendo que a

maior atividade do MXR em animais coletados em locais poluídos resulta em um menor acúmulo de ROD nos tecidos (Kurelec et al. 2000).

Alguns compostos, denominados quimiossensibilizadores, podem alterar a eficiência do MXR em organismos aquáticos (Kurelec 1997). Esses compostos podem saturar a atividade de bombeamento da Pgp, afetando a resistência dos animais e, assim, tornando-os sensíveis aos contaminantes presentes no ambiente. Os quimiossensibilizadores são detectados em amostras ambientais de locais que recebem efluentes de esgoto doméstico e industrial, bem como, em locais não contaminados (Kurelec et al. 1998, Smital & Kurelec 1998a, Smital & Kurelec 1998b, Bard 2000).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vivo* os efeitos causados pela exposição a óleo diesel comercial, no mecanismo MXR de mexilhões *Perna perna* (L.), uma fonte alimentar importante no estado de Santa Catarina (Bainy et al. 2000).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Mexilhões.** Espécimens de *Perna perna* (L.), com 40 mm de comprimento total em média, foram coletados no cultivo experimental do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) – UFSC, localizado na Praia do Sambaqui, Florianópolis, SC, Brazil (Fig. 1). Além do comprimento total, foram registrados ainda o peso total e o sexo de todos os animais analisados.

**Ensaio de transporte de Rodamina B *in vivo*.** As condições dos ensaios foram adaptadas de Kurelec et al. (2000). Os ensaios *in vivo*, consistem basicamente em comparações entre o acúmulo intracelular de Rodamina B (ROD), na presença e na ausência do inibidor competitivo verapamil (VER) (Cornwall et al. 1995, Epel, 1998, Kurelec et al. 2000). Considera-se que o acúmulo de substrato, observado na presença do inibidor forneça um índice da sua difusão na ausência de atividade de transporte da Pgp (Epel 1998). Após cada ensaio, 0,14 g de brânquia de cada espécime foi retirado, rapidamente lavado e homogeneizado em 1 mL de água destilada. As amostras foram centrifugadas a 3.000 xg por 7 min e a fluorescência do sobrenadante foi quantificada em um fluorímetro (Quantech, modelo FM 109515).

CALIBRAÇÃO DO FLUORÍMETRO		
µg/L	[ ROD B]	
4790	$1 \times 10^{-5}$	10 µM
2395	$5 \times 10^{-6}$	5 µM
479	$1 \times 10^{-6}$	1 µM
239,5	$5 \times 10^{-7}$	0,5 µM
47,9	$1 \times 10^{-7}$	0,1 µM
23,95	$5 \times 10^{-8}$	0,05 µM
4,79	$1 \times 10^{-8}$	0,01 µM
2,39	$5 \times 10^{-9}$	0,005 µM
0,48	$1 \times 10^{-9}$	0,001 µM
Solução estoque de ROD = 12 mg/mL		

**Exposição simultânea a ROD e óleo diesel.** Foram realizados dois ensaios.

No primeiro, os mexilhões foram aclimatados em laboratório por três dias, sendo mantidos em água do mar filtrada (AMF) (125 mL/animal), sob aeração constante e temperatura controlada (20-25° C). Durante este período, os animais não foram alimentados. Ao término da aclimação, os mexilhões foram divididos em três recipientes com 500 mL de AMF, contendo ROD (1,5 µM) (Sigma) (n = 4 por grupo). Ao grupo controle foram adicionados 50 µl de DMSO (veículo de diluição do VER). O grupo inibido foi exposto a VER (20 µM) e o outro grupo foi exposto ao óleo diesel comercial (PETROBRÁS) (0,1 % w/v). Após 2 h de exposição, os animais foram analisados. O segundo ensaio apresentou o mesmo delineamento, utilizando, no entanto, animais não submetidos a uma aclimação prévia.

**Exposição simultânea a ROD e diferentes concentrações de óleo diesel.**

Os mexilhões recém coletados, foram divididos em seis grupos e mantidos em recipientes de 500 mL de AMF, contendo ROD (Sigma) (1.5 µM) (n = 4 por grupo). As condições do grupo controle e do grupo tratado com VER (inibido) foram as mesmas descritas acima. Diferentes concentrações de óleo diesel (0,001 %; 0,01 %; 0,1 % and 0,5 %, w/v) foram testadas. Após 3 h de exposição, os animais foram analisados.

**Avaliação do acúmulo de ROD com e sem pré-exposição a óleo diesel.**

Foram realizados dois ensaios, no primeiro, os mexilhões foram aclimatados por 4 dias, sendo a AMF renovada diariamente e a alimentação com algas (1.7

$\times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>) realizada duas vezes ao dia. Um grupo (pré-exposto) (n = 8) foi mantido em um recipiente com 500 mL de AMF, contendo óleo diesel 0.1%, enquanto um segundo grupo (referência), foi mantido em outro recipiente com o mesmo volume de AMF. Após 1 e 24 h de exposição, os dois grupos foram sub-divididos e tratados como grupo inibido e grupo controle (n = 4 por grupo), conforme descrito acima. Após 3 horas de exposição, os mexilhões foram analisados. No segundo ensaio, o mesmo experimento foi realizado sem aclimação prévia e com períodos de pré-exposição de 5 e 24 horas, respectivamente.

**Avaliação do acúmulo de ROD com e sem pré-exposição a óleo diesel, seguida ou não da renovação da água do mar.** Os mexilhões foram divididos em dois grupos distintos: o grupo de pré-exposição (n = 16), mantido em um recipiente com 2 L de AMF e óleo diesel 0,1% w/v, e o grupo referência (n = 8), mantidos em recipientes com 1 L de AMF. Após 4 h, o grupo referência foi subdividido e tratado como grupo controle e grupo inibido, conforme descrito anteriormente. O grupo exposto a óleo diesel foi subdividido em quatro subgrupos (n = 4). Dois deles foram mantidos na mesma água da pré-exposição, enquanto os outros dois receberam 500 mL de AMF limpa. A todos os recipientes foi adicionado ROD (Sigma) (1,5  $\mu$ M). Desses grupos, dois receberam VER (grupo inibido). Após 3 h de exposição, os mexilhões foram analisados.

**Avaliação do efluxo de ROD na presença de óleo diesel.** Os mexilhões foram incubados na presença de ROD (Sigma) (1,5  $\mu$ M) por 2 h (T<sub>0</sub>).

Ao término desse período, os animais foram separados em quatro recipientes ( $n = 4$ ), contendo 500 mL de AMF, para cada período de efluxo avaliado (15, 40 e 60 minutos). DMSO foi adicionado ao grupo controle e VER (20  $\mu\text{M}$ ) foi acrescentado ao grupo inibido. Dois grupos expostos a óleo diesel (0.1%) foram utilizados nas análises, sendo um deles tratado com VER (20  $\mu\text{M}$ ). Um grupo foi incubado com ROD (Sigma) (1,5  $\mu\text{M}$ ) por 210 min. Ao término de cada período testado, os mexilhões foram analisados.

#### **Avaliação do mecanismo MXR após exposição a contaminantes *in situ*.**

Os mexilhões foram separados individualmente em redes cilíndricas, as quais foram fixadas em duas balsas flutuantes de PVC. Uma delas foi mantida junto ao cultivo experimental do LCMM, na Praia do Sambaqui (SAM), onde os animais foram coletados, enquanto a segunda foi colocada próximo à Ponte Hercílio Luz, na Baía Norte (BN) (Fig. 1). Seis mexilhões (30 - 40 mm) foram coletados em SAM, no dia da montagem e fixação das balsas ( $T_0$ ). Após intervalos de 1 ( $T_1$ ), 7 ( $T_7$ ) e 14 ( $T_{14}$ ) dia, dez animais foram coletados de cada um dos locais. Quatro mexilhões foram utilizados para análise de Western blotting (vide abaixo), enquanto os seis restantes foram utilizados para a avaliação da atividade da Pgp. Os resultados foram expressos como taxa de acúmulo de ROD (média do acúmulo dos animais expostos ao VER/média dos animais controle), onde valores de acúmulo de ROD  $>1$  representam um transporte eficiente e valores  $\leq 1$  indicam saturação do transporte.

**Western Blotting.** Foram utilizadas amostras de brânquias (0,3 g) de animais: (1) expostos a óleo diesel por 1, 2, 4 e 24 horas, previamente aclimatados às

condições de laboratório (4 dias); (2) utilizados nos ensaios de avaliação da captação de ROD, com e sem pré-exposição a óleo diesel 0.1 % por 5 e 24 h, sem aclimação prévia às condições de laboratório; e (3) do experimento de avaliação in situ. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão hipotônico de lise (150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris HCl pH 7,4; 0,1 % w/v SDS; 1 % w/v Triton X-100; 1 % w/v deoxicolato de sódio; 2 mM PMSF e 2 mM de coquetel de inibidores de protease) e centrifugadas a 10.000xg por 10 min a 4°C. Alíquotas do sobrenadante (20 µg de proteína) foram preparadas em igual volume de tampão da amostra (67 mM Tris-HCl pH 6,8; 2,2 % w/v SDS; 11,1 % w/v glicerol, 0,5 % w/v azul de bromofenol e 1,54 % w/v DDT) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (gel de concentração 3,9 %, gel de separação 7,5 %), em condições desnaturantes (PAGE/SDS). A eletrotransferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Kurelec et al. (2000). Para a imunodeteção foi utilizado o anticorpo monoclonal C219 (1:300, Signet Laboratories). O complexo imune foi visualizado por quimiluminescência, utilizando-se um kit comercial (ECL, Amersham-Pharmacia). A intensidade das bandas foi quantificada, após digitalização da imagem do filme autorradiográfico, com o software Scion Image®. A comparação relativa da intensidade das bandas imunoreativas das amostras foi realizada utilizando-se uma mesma amostra, reativa com o anticorpo e presente em todos os géis. Os resultados da imunodeteção da Pgp foram expressos como unidades arbitrárias (densidade integrada/µg proteína).

**Determinação de proteínas.** A dosagem de proteínas totais nas alíquotas dos sobrenadantes das amostras foi realizada de acordo com Peterson (1977).

**Análise de parâmetros físico-químicos da água do mar no experimento *in situ*.** Foram coletadas amostras de água a 30 cm da superfície. Nessas amostras foram quantificados os valores de salinidade e pH. A temperatura foi medida no momento da coleta dos animais. Os outros parâmetros analisados na água foram obtidos junto ao LCMM.

**Análises estatísticas.** Os dados obtidos durante os ensaios foram submetidos a um teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a aderência a normalidade. Neste caso, as diferenças entre os tratamentos foram analisadas aplicando-se uma análise de variância de uma via, com nível de significância igual a  $P \leq 0,05$ . Comparações Post-Hoc foram realizadas através do teste Tukey HSD para grupos de mesmo tamanho amostral. Dados que não aderiram à distribuição normal foram comparados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas não paramétricas (Zar 1984, Sokal & Rohlf 1994). Uma matriz de correlação entre a taxa de acúmulo de ROD nos animais referência, do experimento de avaliação *in situ*, e os parâmetros ambientais avaliados em SAM, foi realizada utilizando-se Statsoft 1998. O nível de significância adotado foi 0,05. O desvio padrão foi a medida de dispersão adotada em todos os tratamentos.

## RESULTADOS

Uma banda protéica com um peso molecular aparente de 170 kDa foi detectada nas brânquias de *Perna perna*, utilizando o anticorpo monoclonal C219, evidenciando a presença de uma proteína pertencente a família dos transportadores ABC, sendo provavelmente a Pgp, conforme previamente observado (Bresolin & Bainy, 2000; Bresolin, 2003) (Fig. 2).

Os mexilhões expostos simultaneamente a ROD e 0,1% de óleo diesel, após terem sido aclimatados, não apresentaram diferenças no acúmulo de ROD em relação ao grupo controle (Fig. 3A). Da mesma forma, nenhuma diferença no acúmulo de ROD foi observada entre os animais controle e os animais expostos a VER. Por outro lado, animais submetidos a condições experimentais similares, sem terem sido, no entanto, aclimatados, apresentaram um acúmulo significativamente maior de ROD no grupo exposto ao óleo diesel e no grupo inibido (VER), distinguindo-se do grupo controle (Fig. 3B).

Mexilhões expostos simultaneamente a ROD e diferentes concentrações de óleo diesel (0,001%, 0,01%, 0,1% e 0,5%) (Fig. 4), não apresentaram diferenças significativas no acúmulo de ROD. Por outro lado, o acúmulo de ROD na brânquia dos animais expostos a VER, foi menor que o observado no grupo controle ( $P < 0,01$ ).

Nenhuma alteração significativa foi observada entre o acúmulo de ROD nas brânquias dos animais pré-expostos a 0,1% de óleo diesel durante 1h e 24 h<sub>1</sub> (animais aclimatados). Os animais do grupo referência-24 h<sub>1</sub> acumularam uma grande concentração de ROD nas suas brânquias ( $>100 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  of tissue) (Fig. 5). Um aumento de 1,7 vezes no acúmulo de ROD foi observado nos

animais expostos a 0,1% de óleo diesel por 5 horas, comparando-se com o grupo referência (animais não aclimatados). Os níveis de ROD nos animais referência 24 h<sub>2</sub> também se mostraram aumentados, em comparação com os animais referência 5 h. Nenhuma alteração no acúmulo de ROD foi observada nos grupos de animais expostos ao óleo por 24 h, adotando-se ou não um período prévio de aclimação (Fig. 5).

Nos animais previamente aclimatados por 4 dias e então expostos a 0,1% de óleo diesel durante 2 h, os níveis de Pgp nas brânquias diminuíram em relação ao grupo referência (Fig. 6A). Todos os outros períodos de exposição testados (1, 4, 5 e 24 h), não causaram nenhuma alteração nos níveis de Pgp, tendo os animais sido aclimatados ou não (Fig. 6B).

O acúmulo de ROD nos mexilhões pré-expostos a 0.1% de óleo diesel durante 4 h e então transferidos para AMF limpa contendo ROD (1,5 µM) e DMSO (controle CW) foi 30% menor que o observado nos animais mantidos em AMF durante 4 h e depois transferidos para ROD (1,5 µM) e DMSO (controle - grupo referência) (Fig. 7). Mexilhões mantidos em AMF por 4 h e posteriormente transferidos para um recipiente contendo VER (inibido – grupo referência), mostraram um aumento de 1,3 vezes no acúmulo de ROD quando comparados com os controles do grupo referência (Fig. 7). Nenhuma alteração significativa no acúmulo de ROD foi observada nos animais expostos que foram transferidos para VER, óleo ou VER e óleo (Fig. 7).

Os resultados dos ensaios delineados para avaliação da influência do óleo sobre o tempo de efluxo de ROD são mostrados na Fig. 8. Após o período de pré-incubação (T<sub>0</sub>), a concentração de ROD no tecido dos mexilhões foi significativamente maior que aquela observada nos animais transferidos para

água com DMSO (controles) após 15 ( $P < 0,01$ ), 40 ( $P < 0,001$ ) e 60 min ( $P < 0,001$ ) de efluxo (Fig. 8). Após os 15 min iniciais ( $T_{15}$ ), o acúmulo de ROD nos animais que foram expostos ao VER e nos animais expostos a VER e 0,1% de óleo, não teve uma diminuição significativa em relação ao acúmulo observado em  $T_0$  (Fig. 8). Os animais expostos apenas ao VER acumularam 2.8 vezes menos ROD em suas brânquias, em comparação com os animais expostos ao VER e 0,1% de óleo diesel. A quantidade de ROD acumulada nos mexilhões mantidos na água com VER não mudou significativamente ao longo do período de 60 min de monitoramento do efluxo (Fig. 8). Os animais mantidos na água com 0,1% de óleo durante 15 e 60 min não apresentaram alterações significativas nos níveis de ROD, comparando-se com o grupo controle (DMSO). Em  $T_{40}$ , o acúmulo de ROD nas brânquias dos animais expostos ao óleo foi 3,4 vezes maior que o observado nos animais controle, mas esta diferença não é estatisticamente relevante. Após 210 min ( $T_{210}$ ) de incubação em ROD ( $1,5 \mu\text{M}$ ), o acúmulo do corante não se mostrou alterado em relação a  $T_0$ , que corresponde a um período de incubação de 120 min (Fig. 8).

A atividade da Pgp avaliada durante o experimento de monitoramento *in situ* é apresentada na Fig. 9A, alterações na taxa de acúmulo de ROD podem ser observadas nos animais coletados em cada intervalo de tempo avaliado em ambos os locais (SAM e BN). Entre todos os períodos de exposição testados nas duas localidades, a taxa no acúmulo de ROD foi  $>1$ , apenas após 14 dias ( $T_{14}$ ) de permanência em BN. A taxa de acúmulo de ROD nos mexilhões mantidos em SAM (grupo referência) em  $T_0$ , bem como nos mexilhões de ambas as localidades após um ( $T_1$ ) e sete dias ( $T_7$ ) de transferência foram  $\leq 1$  (Fig. 9). Foi possível estabelecer uma correlação entre a aparente saturação do

transporte, observada nos animais referência de  $T_0$  e  $T_1$ , e o aumento na turbidez da água em SAM observada nestes dias (Tab. 1). Alguns animais que fizeram parte do experimento de avaliação *in situ* tiveram os níveis de Pgp expressa avaliados através de Western Blotting (Fig. 9B). Nenhuma diferença significativa foi observada, nem em função dos diferentes locais nem em função dos diferentes intervalos de tempo adotados neste experimento.

## DISCUSSÃO

A detecção de uma banda de peso molecular aparente igual a 170 kDa, reativa com o anticorpo monoclonal C219, na brânquia do mexilhão *Perna perna* indica a presença de uma proteína correspondente a Pgp nesta espécie de molusco (Fig. 2). A exposição a óleo diesel (0,1%) não alterou os níveis de Pgp neste tecido, independente dos tempos de exposição testados (1 a 24h) e da adoção ou não de um período prévio de aclimação às condições laboratoriais (Fig. 6).

Esta observação pode estar relacionada à existência de níveis constitutivos de Pgp elevados nas brânquias dos mexilhões *P. perna*, capazes de proteger o animal contra os efeitos tóxicos do óleo diesel. Foi sugerido que níveis basais altos de Pgp nas brânquias de animais filtradores possam ter surgido, ao longo da evolução, em resposta a uma dieta rica em substratos do MXR, presentes nas algas e no fitoplâncton (Bard 2000, Keppler & Ringwood 2001). Talvez isso possa explicar porquê os níveis de Pgp detectados nas brânquias dos mexilhões transplantados para BN não tenham sofrido alterações significativas, em comparação com os níveis observados nos animais referência (SAM) (Fig. 9B).

Os resultados dos experimentos para avaliação da influência do óleo diesel sobre o mecanismo MXR, devem ser interpretados com cautela, pois os períodos de exposição adotados no presente trabalho, foram inferiores ou iguais a 24 h. Outros estudos realizados para avaliação da indução do mecanismo MXR por xenobióticos adotaram períodos de exposição mais longos (Eufemia & Epel 2000, Kurelec et al. 2000, Sturn, Cravedi & Segner 2001, Haumdoum, Griffin & Cherr 2002). Os resultados obtidos através da

técnica de *Western blotting* confirmaram a presença de uma proteína *Pgp-like* nos mexilhões utilizados nos ensaios, não podendo, no entanto, ser utilizados para avaliar a indução do MXR em função da exposição ao óleo diesel.

Nos primeiros experimentos realizados para avaliação da influência do óleo diesel sobre o transporte de ROD *in vivo*, foi utilizado um período de aclimação às condições laboratoriais para que a atividade da Pgp retornasse aos níveis basais, revertendo uma eventual indução do MXR existente nos animais antes da coleta (Smital & Kurelec 1998b). No entanto, utilizando-se animais aclimatados, não foi possível detectar alterações no acúmulo de ROD em função da presença do óleo diesel, já que, como mencionado acima, os períodos de exposição ao xenobiótico não se mostraram suficientes para promover uma indução ou inibição significativa do MXR (Fig. 3A e Fig. 5, 1h e 24h<sub>1</sub>).

Estudos efetuados por Smital & Kurelec (1998b), demonstraram a capacidade do óleo diesel de induzir o MXR (aumentando a atividade da Pgp) em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* após três dias de exposição. Por outro lado, Haumdoum et al. (2002) observaram que a fração solúvel em água do óleo diesel biodegradado é capaz de aumentar o acúmulo de ROD em embriões de *Urechis caupo*, indicando que o óleo diesel é substrato para o transporte mediado pela Pgp, sendo capaz de saturar o mecanismo MXR. Acreditando que o óleo diesel também seja substrato para o transporte mediado pela Pgp em *Perna perna*, a ausência de modificações no acúmulo de ROD, pode estar relacionado à manutenção dos animais no laboratório por períodos superiores a 12 horas. Assim sendo, optou-se pela manutenção de períodos de exposição menores ou iguais à 24h (não suficientes para

induzir/inibir significativamente a Pgp), utilizando-se, no entanto, mexilhões não aclimatados previamente.

A não aclimação às condições laboratoriais, permite avaliar o nível de indução do MXR apresentado por esses animais no ambiente, antes da coleta. A exposição ao óleo diesel foi utilizada para uma melhor avaliação da eficiência no transporte via Pgp, pois sendo este um substrato para o transporte, deveria competir com a ROD pelo sítio de ligação com a proteína, assim como o VER. Os animais que não foram aclimatados apresentaram uma diminuição na eficiência do transporte da ROD pela Pgp na presença de VER e de óleo diesel 0,1% (Fig. 3B), como esperado.

No entanto, nos mexilhões expostos simultaneamente a ROD e a diferentes concentrações de óleo diesel por 3 h, nenhuma alteração aparente na taxa de acúmulo de ROD foi observada em função da presença de óleo diesel na água (Fig. 4). A adição de VER ao meio causou uma diminuição na concentração de ROD no tecido para cerca de  $5 (\mu\text{g}/\mu\text{g tecido}) \times 10^{-4}$ . Epel (1998) afirma que em situações em que a capacidade de transporte da Pgp se apresenta saturada, a adição de VER não acarreta em alterações significativas no acúmulo de ROD. Neste mesmo artigo, discute ainda os casos em que foi observada uma diminuição no acúmulo de ROD na presença de VER, levantando como hipótese para explicar este intrigante comportamento, a possível ativação de outro transportador, que não a Pgp. Sendo assim, provavelmente, a ausência de diferenças no acúmulo de ROD entre os animais expostos as diferentes concentrações de óleo, observada no presente estudo, possa estar relacionada com a saturação do transporte via Pgp nestes

mexilhões, em função da existência de uma alta concentração de substratos no ambiente (SAM).

A presença no ambiente de substâncias tóxicas e não-tóxicas (naturais ou sintéticas), substratos para a Pgp, pode saturar o sistema de transporte (Kurelec et al. 1998a). Tais substâncias têm sido denominadas quimiossensibilizadores, que em função da capacidade de bloquear o MXR, são considerados entre os primeiros na escala de poluentes mais perigosos para os ecossistemas aquáticos (Kurelec 1997, Kurelec et al. 1998, Smital & Kurelec 1998a, Kurelec et al. 2000, Bard 2000).

A diminuição no acúmulo de ROD na presença de VER em relação ao acúmulo do grupo controle, também foi observada nos ensaios realizados para avaliação da atividade da Pgp, antes do experimento de exposição *in situ* ser efetuado ( $T_0$ ) e no grupo referência 24 horas após a montagem das balsas ( $T_1$ ) (Fig. 9A). Nestes dois ensaios, os animais controle acumularam quase 2 vezes mais ROD nas brânquias que os animais expostos ao VER. Tendo sido confirmada a saturação do mecanismo MXR nos animais referência em  $T_0$  e  $T_1$ , através do estabelecimento de uma correlação entre a diminuição na eficiência no transporte da Pgp e o aumento na concentração de compostos orgânicos na água (turbidez) nestes períodos (Tab. 1). Kurelec et al. (1998) afirmam que em estudos de campo, foi observada uma correlação entre a quantidade de matéria orgânica e a inibição do MXR, sugerindo que a alta concentração de moléculas orgânicas, reconhecidas como substratos do MXR, satura a capacidade de bombeamento da Pgp.

A introdução do VER na água deve expor os animais, que apresentam a capacidade de transporte da Pgp saturada, a uma situação potencialmente

estressante, já que o composto, além de ser considerado um inibidor competitivo modelo para a Pgp (Garrigos et al. 1993, Cornwall et al. 1995, Sikic et al. 1997, Ambudkar et al. 1999, Kurelec et al. 2000), é um bloqueador de canais de cálcio e causador de estresse hiposmótico em *Perna perna* (Stucchi-Zucchi & Salomão 1998, Ferreira & Salomão 2000). Sendo assim, a diminuição no acúmulo de ROD nos animais expostos ao VER pode estar relacionado com a ativação de algum mecanismo de regulação osmótica, como por exemplo, a indução de transportadores responsáveis pelo controle do conteúdo de água intracelular ou alterações na permeabilidade da membrana plasmática, além disso, *Perna perna* costuma fechar suas valvas como forma de proteção contra situações de stress hiposmótico, reduzindo o contato com o meio externo (Stucchi-Zucchi & Salomão 1998, Ferreira & Salomão 2000).

O aumento do efeito tóxico de substâncias em função da inibição do MXR foi descrito em *Corbicula fluminea* (bivalve de água doce), onde o efeito genotóxico dos aminoantracenos (AA) foi aumentado pela presença de moduladores do MXR (Waldman et al., 1995). Mexilhões de água doce, *Dreissena polymorpha*, expostos a 2-aminofluoreno (AF) e benzo(a)pireno (B(a)P) apresentaram um aumento na produção de metabólitos mutagênicos, quando expostos a água de um rio conhecidamente poluído (Britvic & Kurelec, 1999).

Segundo Kurelec et al. (2000), é necessário saber se o aumento no acúmulo da ROD no meio intracelular em experimentos de exposição simultânea é devido a inibição do efluxo (transporte) e não a uma alteração na taxa de difusão do corante. Para elucidar este ponto, foram efetuados experimentos para avaliar a influência da pré-exposição ao óleo sobre a taxa

de entrada de ROD (Fig. 5). Após 5 horas, os animais pré-expostos ao óleo diesel acumularam 1,7 vezes mais ROD que o grupo referência, indicando que o MXR estava induzido nestes animais no momento da coleta. Após 24 horas de pré-exposição ao óleo, a concentração de ROD nas brânquias dos animais não se mostrou significativamente diferente daquela observada após 5h de pré-exposição (Fig. 5).

No entanto, observou-se um aumento no acúmulo de ROD nos grupos referência mantidos por 24h em água do mar filtrada, tanto nos animais previamente aclimatados (24h<sub>1</sub>) quanto nos não aclimatados (24h<sub>2</sub>). Talvez a taxa de entrada de ROD tenha sido bem maior nestes animais em função de um aumento nas taxas de filtração nas brânquias, em resposta ao jejum de 24h ou ao aumento da concentração de compostos nitrogenados na água. Tais possibilidades devem ser esclarecidas em estudos futuros. De qualquer maneira, nos animais pré-expostos ao óleo, a taxa de entrada de ROD não foi significativamente alterada em nenhum dos tempos testados, indicando que o aumento no acúmulo de ROD observado nos ensaios de exposição simultânea a ROD e óleo diesel (Fig. 3B), se deve a aparente inibição do efluxo da ROD por competição com óleo, através da ligação a Pgp e não ocorre em decorrência de alterações na taxa de entrada da ROD.

Em experimentos de avaliação da taxa de entrada de ROD com e sem pré-exposição ao óleo, e na presença e ausência de renovação da água (Fig. 7), os animais referência acumularam 1,3 vezes mais ROD nas brânquias na presença de VER, indicando que o mecanismo MXR estava ativo no momento da coleta. Os animais pré-expostos ao óleo diesel (4 h) e que foram transferidos para água com DMSO (ausência de substrato), mostraram uma

diminuição no acúmulo de ROD ( $\cong 1,8$  vezes) em relação aos animais que foram pré-expostos ao óleo e mantidos na água com substratos (VER, óleo, e óleo e VER). Estes resultados indicam que a presença de substratos do MXR na água dificulta o efluxo da ROD do meio intracelular (Fig. 7).

A avaliação da influência do óleo diesel sobre o efluxo da ROD mostrou que o acúmulo do corante diminuiu rapidamente quando os animais foram transferidos para a água com DMSO (ausência de substratos) (Fig. 8). Após os 40 min iniciais, o acúmulo foi reduzido quase 9 vezes ( $T_0/T_{40}$ ). Após este período, a diferença observada foi menor ( $T_{40}/T_{60}$ ), pois já existia uma concentração bastante baixa de ROD na brânquia após os 40 min iniciais. A presença de 20  $\mu$ M de VER na água diminuiu a taxa de transporte da ROD para fora da célula em comparação com o grupo controle em todos os tempos testados. A presença de 0,1% de óleo diesel na água, pareceu não afetar o transporte da ROD para fora da célula, pelo menos não da mesma maneira que o VER. No entanto, o efeito da combinação dos dois pareceu inibir mais a atividade da Pgp, que a inibição causada pelo VER isoladamente, pelo menos nos 15 minutos iniciais ( $T_{15}$ ) (Fig. 8).

Em relação ao estudo para avaliação do mecanismo MXR, podemos sugerir que, após exposição *in situ*, o sistema de transporte da Pgp estava aparentemente saturado (VER/controlado  $<1$ ) em  $T_0$ , bem como nos animais mantidos em SAM por 1 dia (Fig. 9A). Os animais que foram transferidos para BN mostraram saturação no transporte após 1 e 7 dias, o mesmo tendo sido observado nos animais referência em  $T_7$ . Após 14 dias, os animais de ambas as localidades acumularam uma quantidade menor de ROD em relação aos outros períodos de exposição. Deve ser salientado que enquanto os animais do

sítio referência (SAM), não apresentaram um transporte eficiente, a indução do MXR (VER/controlado  $\geq 1$ ) mostrou-se evidente nos animais transferidos para a BN (Fig. 9A).

O mexilhão *Perna perna* parece apresentar uma boa tolerância a presença de contaminantes no ambiente. Nesta espécie, os parâmetros hemato-imunológicos analisados por Pires et al. (1998), não foram alterados após exposição ao óleo diesel. Um estudo comparativo dos efeitos bioquímicos do pesticida carbofuran, sobre *Perna perna* e a ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*, mostrou que os mexilhões são menos susceptíveis aos efeitos tóxicos deste composto (Alves et al. 2002). Da mesma forma, indivíduos desta espécie de mexilhão mantidos em BN por até 180 dias, não apresentaram alterações significativas na atividade de algumas enzimas antioxidantes em relação aos animais do sítio referência (SAM), mostrando que estes mexilhões conseguem sobreviver nestas condições, sem o estabelecimento de estresse oxidativo (Bainy et al. 2000). Em um estudo comparativo sobre a tolerância a cloração em cinco espécies de mexilhões marinhos tropicais, Rajagopal et al. (2003) observaram que *P. perna* ocupa uma posição intermediária, com 100% de mortalidade ocorrendo aproximadamente após 500 h de aplicação constante de cloro na água ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

A aparente tolerância que essa espécie de molusco apresenta em relação a presença de xenobióticos na água talvez esteja relacionada à indução do mecanismo MXR. Os resultados obtidos no presente estudo permitem afirmar que *P. perna* expressa uma proteína relacionada a Pgp nas brânquias, não sendo possível, no entanto, detectar alterações na quantidade da sua expressão, em função da exposição ao óleo diesel (1 – 24h) ou da

permanência dos animais em um local contaminado com esgoto doméstico (1 – 14 dias).

Apesar disso, foram observadas alterações no mecanismo MXR, relacionadas a diferenças nos parâmetros do ambiente existentes entre as diferentes datas de coleta. Em algumas situações, o transporte apresentava-se saturado, com os sítios de ligação da proteína ocupados por substratos antes da execução dos ensaios. Em um dos ensaios, pôde-se estabelecer uma correlação positiva entre o aumento da turbidez da água e a saturação da capacidade de transporte da Pgp. Este comportamento não é necessariamente desencadeado pela presença de xenobióticos na água. Entretanto, os animais com o transporte bloqueado perdem a capacidade de lidar com compostos químicos tóxicos, presentes tanto na sua dieta habitual (algas, dinoflagelados) quanto na água, se esta estiver contaminada por alguma classe de poluente.

Foi observado que nos mexilhões com a capacidade de transporte saturada, a presença do VER na água pode ser estressante, relacionando-se, talvez, ao efeito que este composto apresenta sobre a osmorregulação nesta espécie. Em função deste efeito apresentado pelo VER, aconselha-se que, nos ensaios de acúmulo/efluxo de ROD sejam testadas pelo menos duas substâncias que funcionem como substratos da Pgp e que não apresentem este possível efeito colateral.

No nosso estudo, a outra substância testada foi o óleo diesel, o qual inibiu o transporte de ROD em ensaios de exposição simultânea, confirmando-o como substrato para o transporte via Pgp. Observou-se que o óleo diesel dificulta o efluxo de ROD do meio intracelular, mas aparentemente não interfere na sua entrada, sendo observado ainda, um efeito aditivo na inibição do efluxo

de ROD, no caso em que os mexilhões foram tratados, simultaneamente, com VER e óleo diesel.

**Referências Bibliográficas:**

- Alves SRC., Severino PC, Ibbotson DP, da Silva AZ, Lopes FRAS, Sáenz LA. Bainy ACD (2002) **Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*.** Mar. Environ. Res., **54**: 241-245.
- Bainy ACD, Almeida EA, Müller IC, Ventura EC, Medeiros ID (2000) **Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil.** Mar. Environ. Res., **50**: 411-416.
- Bard SM (2000) **Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms.** *Aquat. Toxicol.*, **48**: 357-389.
- Borst P, Elferink O (2002) **Mammalian ABC transporters in health and disease.** *Ann. Ver. Biochem.*, **71**: 537-592.
- Brasil MMA/Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal) (1996) **Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União (1:1.000.000), MCD/MMA, Brasília, Distrito Federal, Brasil.**
- Bresolin T, Bainy ACD (2000) **Detection of Pgp-like proteins in the mussel *Perna perna*.** Res. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular – SBBq.
- Britvic S, Kurelec B (1999) **The effects of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in waters spiked with premutagens.** *Aquat. Toxicol.*, **47**:107-116.

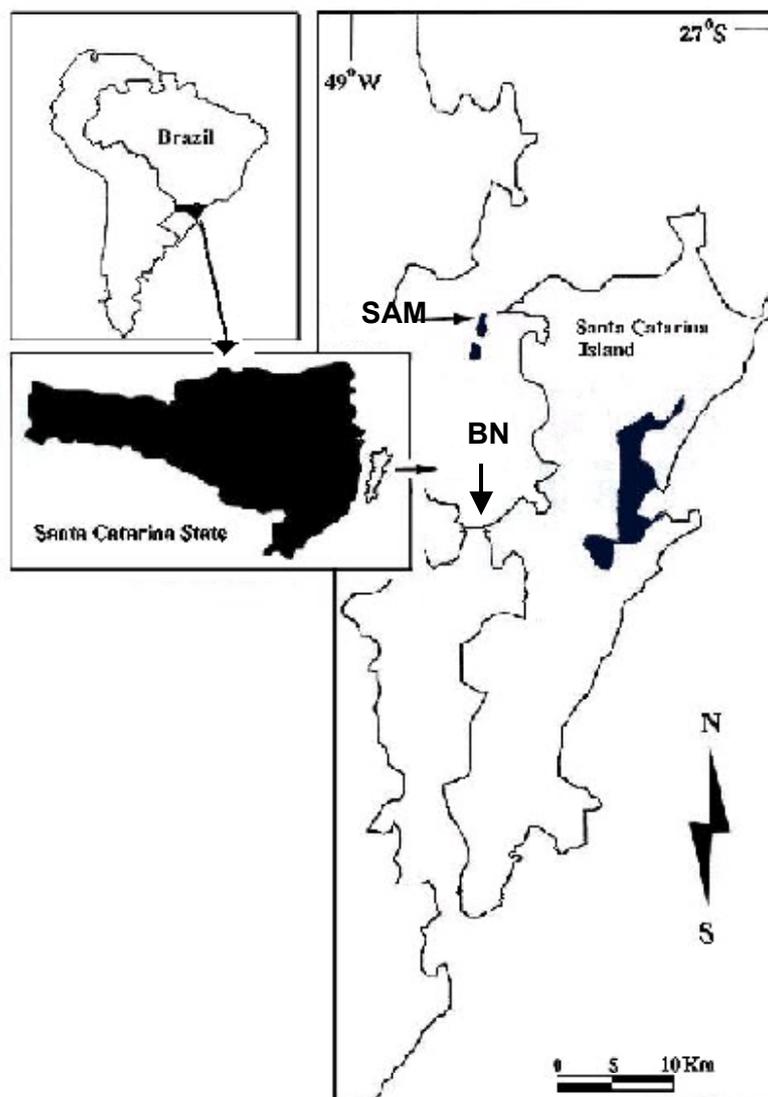
- Cornwall R, Toomey BH, Bard S, Bacon C, Jarman WM, Epel D (1995) **Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates.** *Aquat. Toxicol.*, **31**: 277-296.
- Endicott JÁ, Ling V (1989) **The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.** *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 137-171.
- Epel D (1998) **Use of multidrug transporter as first lines of defense against toxins in aquatic organisms.** *Comp. Biochem. Physiol.*, **120** (A): 23-28.
- Eufemia NA, Epel D (2000) **Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stress.** *Aquat. Toxicol.*, **49**: 89-100.
- Ferreira RP, Salomão LC (2000) **The ionic basis of cardiac activity in the bivalve mollusc *Perna perna*.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **249**: 1-12.
- Garrigos M, Belehradec JJ, Mir LM, Orłowski S (1993) **Absence of cooperativity for MgATP and verapamil effects on the ATPase activity of P-glycoprotein containing membrane vesicles.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**(3): 1034-1041.
- Gottesman MM, Pastan I (1993) **Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.** *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 385-427.
- Haumdoum AM, Griffin FJ, Cherr GN (2002) **Tolerance to biodegraded oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter.** *Aquat. Toxicol.*, **61**: 127-140.

- Keppler C, Ringwood AH (2001) **Expression of P-glycoprotein in the gill of oysters, *Crassostyrea virginica*: seasonal and pollutant related effects.** *Aquat. Toxicol.*, **54**: 195-204.
- Kurelec B (1992) **The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organism.** *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**: 23-43.
- Kurelec B (1997) **A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance.** *Environ. Health Perspec.*, **105**(4): 855-860.
- Kurelec B, Britvic S, Pivčeviač B, Smital T (1998) **Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment.** *Mar. Environ. Res.*, **46**: 415-419.
- Kurelec B, Smital T, Pivčeviač B, Eufemia N, Epel D (2000) **Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers.** *Ecotoxicology*, **9**: 307-327.
- Minier C, Galgani F (1995) **Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*.** *Mar. Environ. Res.*, **39**: 267-270.
- Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C (2000) **Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*.** *Aquat. Toxicol.*, **50**: 167-176.
- Peterson GL (1977) **A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.** *Anal. Biochem.*, **83**: 346-356.
- Pires K, Gargioni R, Marques MRF, Barracco MA (1998) **Avaliação de parâmetros hematológicos em mexilhões *Perna perna* expostos ao óleo diesel.** Res. XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Caxambu - MG, Brasil. **145**.

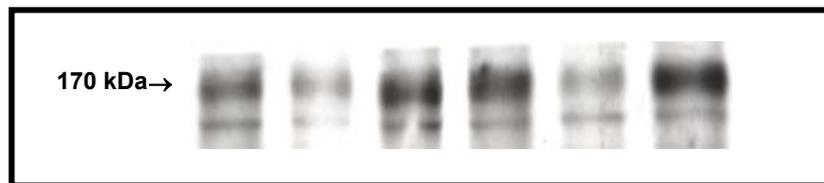
- Rajagopal S, Venugopalan VP, Van der Velde G, Jenner HÁ (2003) **Tolerance of five tropical marine mussels to continuous chlorination.** Mar. Environ. Res., **55**: 277-291.
- Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G (1997) **Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein.** Cancer Chemother. Pharmacol., **40**:S13-S19.
- Smital T, Kurelec B (1998a) **The chemosensitizer of multidrug resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants.** Mutat. Res., **399**: 43-53.
- Smital T & Kurelec B (1998b) **The activity of multidrug resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure.** Mar. Environ. Res., **46** (15): 443-447.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1994) **Biometry.** 3<sup>rd</sup> Ed. Freeman & Company, New York, USA.
- Stucchi-Zucchi A, Salomão LC (1998) **The ionic basis of membrane potentials and adaptation to hyposmotic stress in *Perna perna*, a osmoconforming mollusc.** Comp. Biochem. Physiol., 121 (A): 143-148.
- Sturn A, Cravedi JP, Segner H (2001) **Prochloraz and nonylphenol diethoxylate inhibit an *mdr1*-like activity *in vitro*, but do not alter hepatic levels of P-glycoprotein in trout exposed *in vivo*.** Aquat. Toxicol., **53**: 215-228.
- Tohda H, Takao M, Kikuchi A, Yasumoto T, Yasui A (1997) **Unstable expression of the multi-drug resistant phenotype in chinese hamster ovary cells resistant to okadaic acid.** Biochem. Biophys. Res. Commun., **232**: 398-402.

Waldmann P, Pivceviac B, Müller WEG, Zahn RK, Kurelec B (1995) **Increasead genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with fresh water clam *Corbicula fluminea***. Mut. Res., **342**: 113-123.

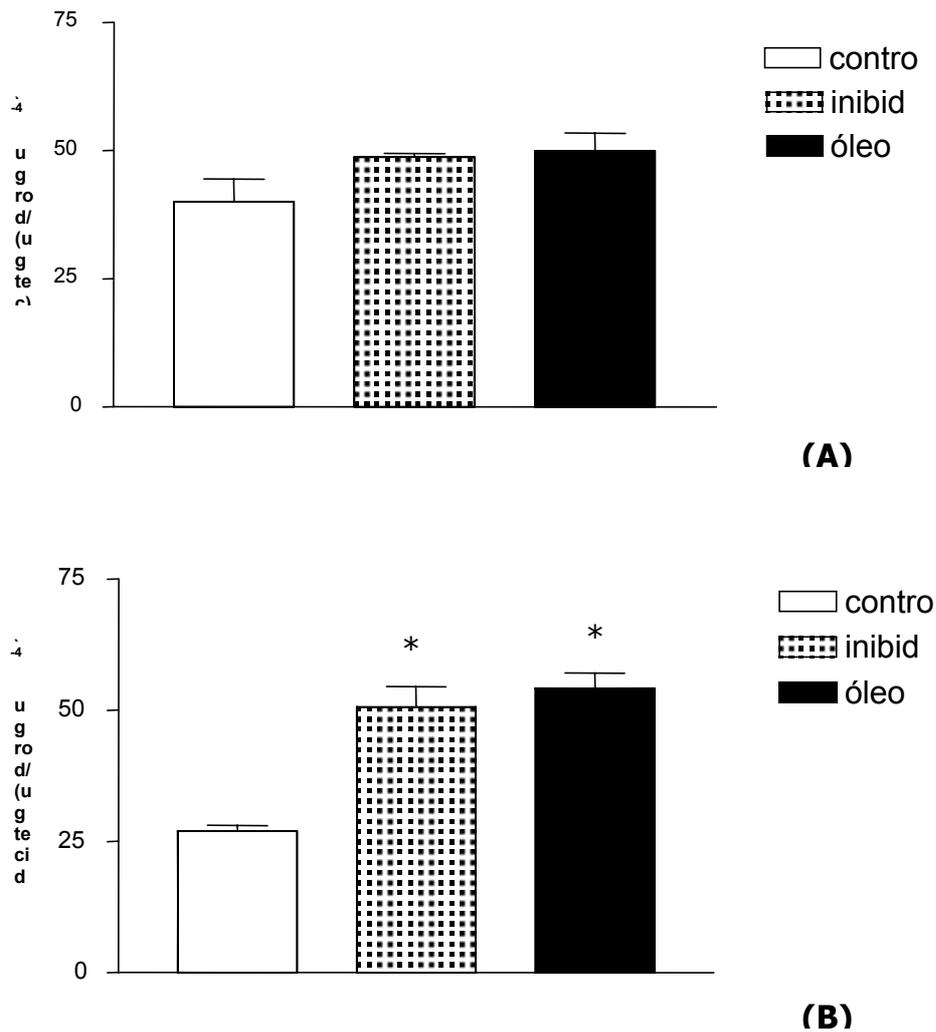
Zar JH (1994) ***Biostatistical Analysis***. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.



**Fig. 1:** Ilha de Santa Catarina - SC. Localização do ponto de coleta dos mexilhões, na área de cultivo da Praia do Sambaqui (**SAM**), e localização do ponto avaliado no experimento *in situ*, Baía Norte (**BN**), nas proximidades da Ponte Hercílio Luz.

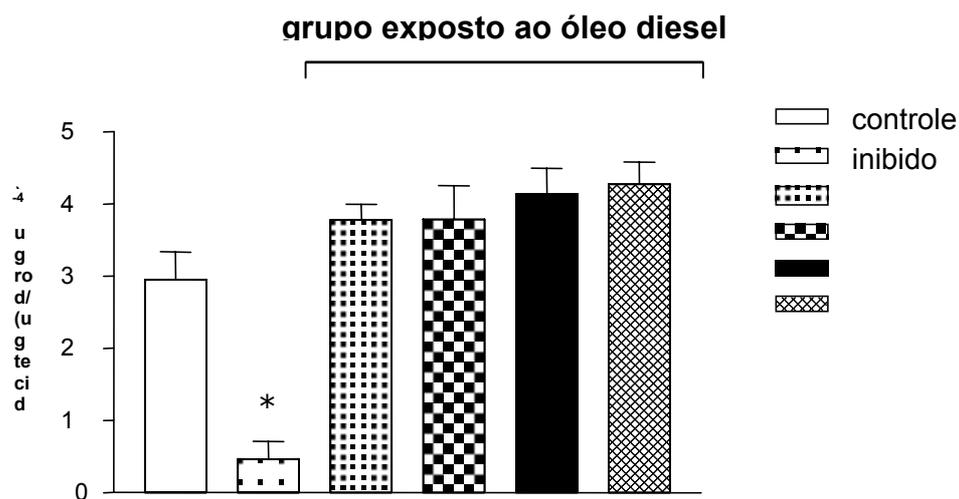


**Fig. 2:** *Perna perna*. Banda de reação positiva detectada nas brânquias de *Perna perna*, através de western blotting, utilizando o anticorpo monoclonal C219.



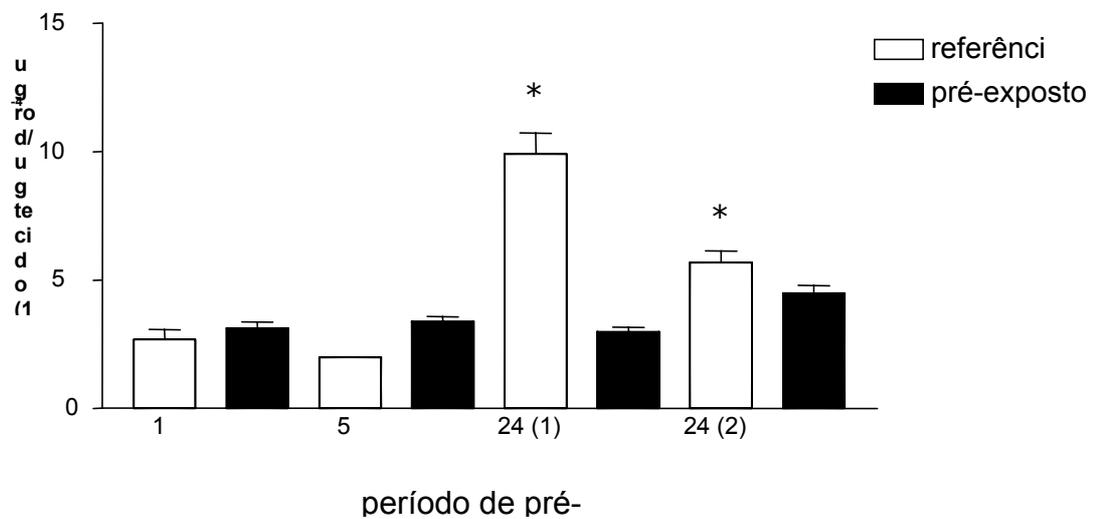
**Fig. 3:** *Perna perna*. Acúmulo de ROD observado nos ensaios de exposição simultânea a ROD e óleo diesel. As amostras de brânquia foram obtidas de mexilhões submetidos a aclimação durante 3 dias (A) e de mexilhões não submetidos a qualquer período de aclimação (B). Os animais foram mantidos em 500 mL de AMF, contendo ROD (1,5 µM). O grupo controle foi tratado com 50 µL DMSO, o grupo inibido foi tratado com VER (20 µM) e o grupo exposto recebeu 0,1 % w/v de óleo diesel.

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .



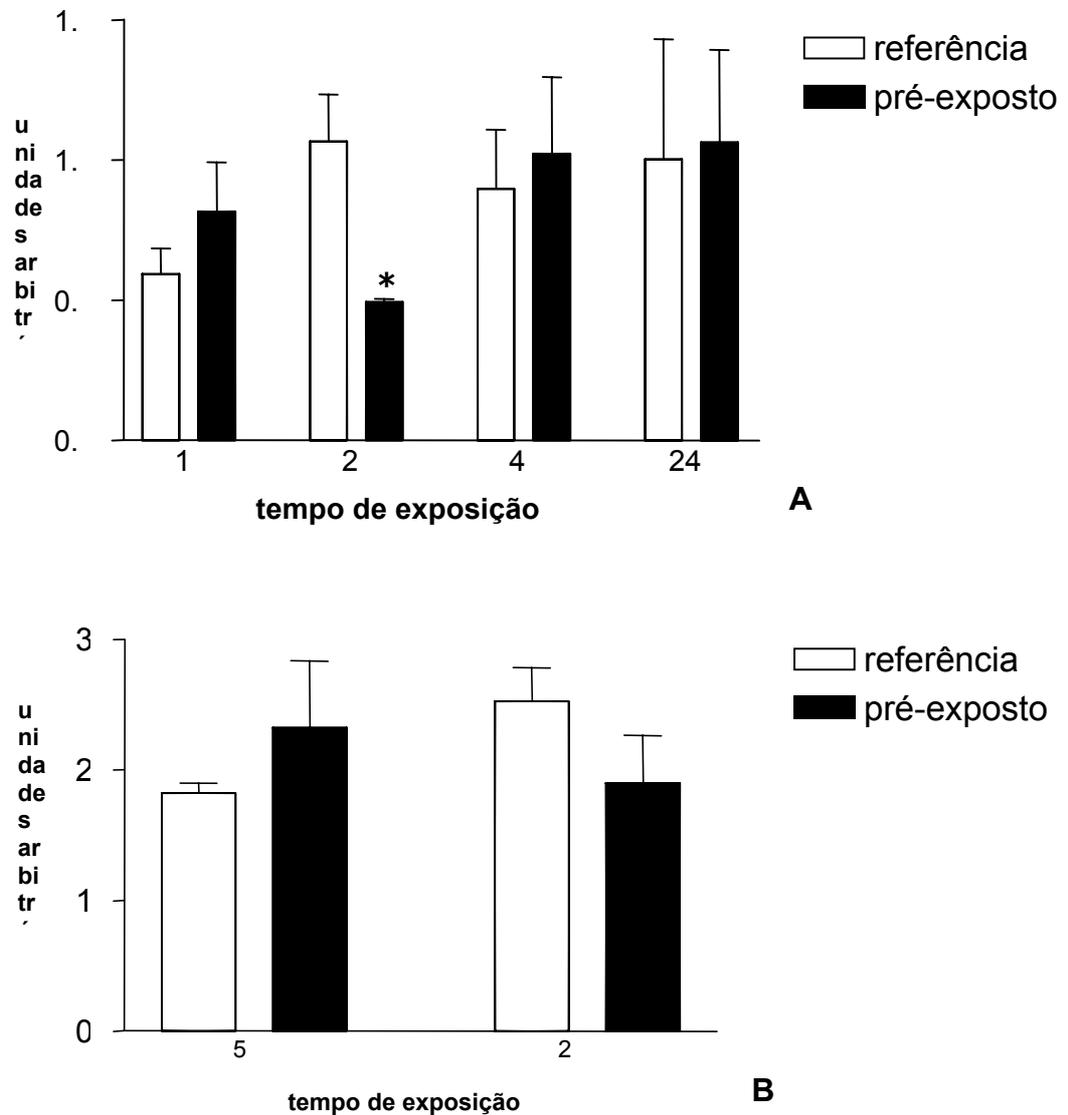
**Fig. 4:** *Perna perna*. Acúmulo de ROD observado nos ensaios de exposição simultânea a ROD e diferentes concentrações de óleo diesel. Os animais foram mantidos em 500 mL de AMF, contendo ROD (1,5 µM). O grupo controle foi tratado com 50 µL DMSO, o grupo inibido com VER (20 µM) e os outros quatro grupos foram expostos ao óleo diesel nas seguintes concentrações 0,001%; 0,01%; 0,1 % e 0,5% w/v.

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .



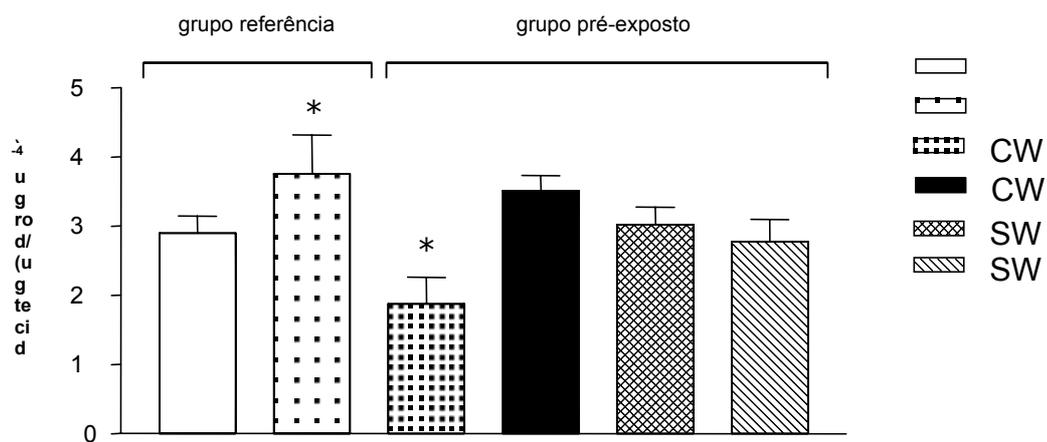
**Fig. 5:** *Perna perna*. Avaliação da entrada de ROD na célula após a pré-exposição ao óleo diesel durante 1h e 24h (1) nos mexilhões submetidos a aclimação em laboratório (4 dias) e durante 5h e 24h (2) nos mexilhões não aclimatados. O grupo referência foi mantido em 500 mL de AMF e o grupo pré-exposto em 500 mL de AMF com 0,1% w/v de óleo diesel.

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .



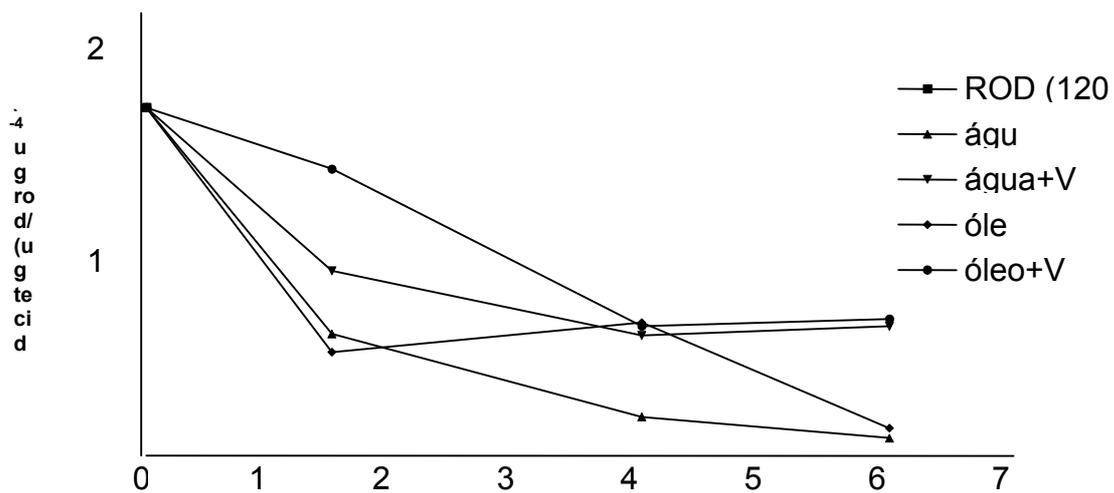
**Fig. 6 :** *Perna perna*. Concentração de Pgp (unidades arbitrárias), medida através de Western blotting, em amostras de brânquia dos mexilhões pré-expostos ao óleo diesel 0,1%, submetidos a aclimação (4 dias) (A) e não submetidos a aclimação (B). Em ambos os ensaios, o grupo referência foi mantido em 500 mL de AMF e o grupo pré-exposto em 500 mL de AMF com 0,1% w/v de óleo diesel.

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .



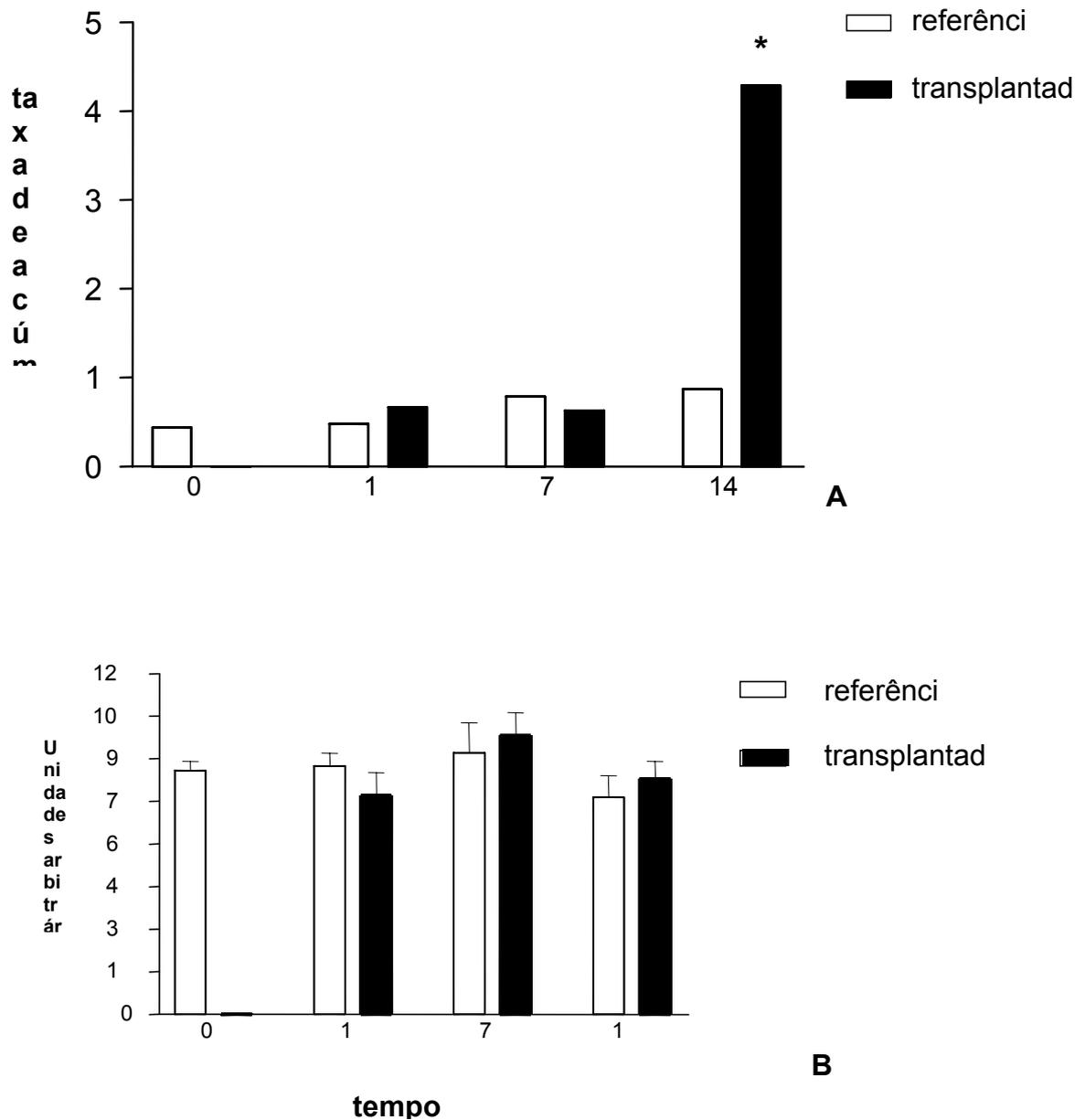
**Fig. 7 :** *Perna perna*. Avaliação da entrada de ROD na célula com e sem pré-exposição ao óleo diesel, seguida ou não da renovação da água do mar. O grupo referência foi mantido em 500 mL de AMF e o grupo pré-exposto em 500 mL de AMF com 0,1% w/v de óleo diesel. Após 4 h, o grupo pré-exposto foi dividido, a água utilizada na pré-exposição foi mantida em dois recipientes (SW) e os outros dois receberam 500 mL de AMF limpa (CW). Todos receberam ROD (1,5  $\mu$ M). Os grupos controle foram tratados com 50  $\mu$ L DMSO e os grupos inibidos com VER (20  $\mu$ M).

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .



**Fig. 8** : *Perna perna*. Avaliação do efluxo de ROD na presença de óleo diesel. Os mexilhões foram incubados em ROD ( $1,5 \mu\text{M}$ ) durante 2 horas ( $T_0$ ) e durante 210 min ( $T_{210}$ ). Após este período de incubação, os mexilhões foram divididos em quatro recipientes contendo 500 mL de AMF, para cada tempo de efluxo testado (15, 40 e 60 min). DMSO foi adicionado ao grupo controle e VER ( $20 \mu\text{M}$ ) foi adicionado ao grupo inibido. Dois grupos foram expostos ao óleo diesel, em um adicionou-se VER ( $20 \mu\text{M}$ ) e no outro não.

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .



**Fig. 9** : *Perna perna*. Avaliação do mecanismo MXR após exposição a contaminantes *in situ*. Em (A), atividade da Pgp (taxa de acúmulo de ROD) e em (B) concentração de Pgp (unidades arbitrárias) nas brânquias do mexilhão *Perna perna* mantidos em SAM (grupo referência) e em BN (grupo transplantado) durante 0, 1, 7 e 14 dias.

\* indica nível de significância  $P \leq 0,05$ .

	Pgp act	Pgp exp	T°C	pH	Turb	Chlo A
Pgp act	<b>1,00</b>					
Pgp exp	0,163	<b>1,00</b>				
T°C	0,961	0,429	<b>1,00</b>			
pH	-0,653	0,64	-0,419	<b>1,00</b>		
Turb	<b>-1,000</b>	-0,182	-0,967	0,638	<b>1,00</b>	
Chlo A	-0,945	-0,476	-0,999	0,37	0,951	<b>1,00</b>

**Tab. 1:** : *Perna perna*. Avaliação do mecanismo MXR após exposição a contaminantes *in situ*. Correlação entre as médias da atividade da Pgp (Pgp act), da expressão da Pgp (Pgp exp) e os parâmetros ambientais analisados (temperatura- T°C, pH, turbidez - Turb e clorofila- Chl A). Correlações em negrito indicam significância estatística ( $P \leq 0.05$ ).

## Capítulo 3

**Avaliação do mecanismo MXR em mexilhões *Perna perna* coletados na Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil**

Priscilla M.M. Lemos, Daniela B.B. Trivella, Taise Bresolin, Eliana C. Ventura, Maria R.F. Marques & Afonso C.D. Bainy \*

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil

Autor para correspondência: FAX + 55 48 331 9672. e-mail address:

[bainy@mbox1.ufsc.br](mailto:bainy@mbox1.ufsc.br)

### **Resumo**

*A atividade da glicoproteína P (Pgp) foi avaliada através de ensaios de acúmulo in vivo de Rodamina B (ROD), na presença e ausência do inibidor competitivo verapamil, em populações de mexilhões Perna perna coletados em diferentes ambientes da Ilha de Santa Catarina-SC. O aumento na expressão/atividade da Pgp é responsável pelo estabelecimento do mecanismo de resistência múltipla a xenobióticos (MXR), considerado como uma linha de frente na defesa celular nos organismos aquáticos. Algumas substâncias, denominadas quimiosensibilizadores, apresentam a capacidade de bloquear o transporte da Pgp, revertendo este mecanismo inerente de resistência. Nossos resultados indicam variação inter-populacional na eficiência do transporte, possivelmente refletindo diferenças nas condições ambientais no momento da coleta. Foram observadas variações no nível de indução do MXR nas quatro populações avaliadas, com mexilhões provenientes de PB (Prainha da Barra da Lagoa) e SM (Praia do Sambaqui) apresentando uma maior atividade que os coletados em JQ (Praia da Joaquina) e MO (Praia do Moçambique). Perna perna mostrou-se resistente à exposição ao óleo diesel comercial, uma vez que o transporte da Pgp não foi inibido pela presença de concentrações de óleo na água que variaram de 0,0001 a 0,5%. Estes resultados indicam que a capacidade de transporte da Pgp, avaliada através de ensaios de acúmulo de ROD, pode ser utilizada como biomarcador de susceptibilidade. No entanto, estudos posteriores são necessários para esclarecer a natureza dos quimiosensibilizadores presentes nestes ambientes.*

*Palavras-chave: Mexilhão, Perna perna, MXR, Pgp, Óleo diesel, Santa Catarina*

### Abstract

*P-glycoprotein (Pgp) activity was evaluated by in vivo Rhodamine B (ROD) accumulation assays, in the presence and absence of competitive inhibitor verapamil, in Perna perna mussel populations, collected at different sites from Santa Catarina Island-SC. Increased Pgp expression/activity is responsible for multixenobiotic resistance (MXR) mechanism, considered as the first line in cellular defense. Some substances, termed chemosensitizers, could saturate the Pgp pumping activity and disrupting the inherent resistance. Our results showed an inter-population variation in the transport efficiency, possibly reflecting differences in environmental conditions during the mussel collections. Variations in MXR induction levels were observed at all populations evaluated. Mussels from PB (Prainha da Barra da Lagoa) and SM (Praia do Sambaqui) showed higher activity than those from JQ (Praia da Joaquina) and MO (Praia do Moçambique). Perna perna was resistant to commercial diesel oil exposure, since the Pgp transport was not inhibited by the presence of diesel oil concentrations from 0.0001 to 0.5 %. These results indicate that Pgp transport capacity, evaluated by ROD accumulation assays, could be used as susceptibility biomarker. However, subsequent analyses need to be carried out to elucidate the identity of the chemosensitizers present in those environments.*

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria dos moluscos bivalves são organismos sésseis, sem capacidade de deslocamento em condições ambientais adversas e se alimentam por filtração, o que garante o contato com poluentes presentes na água, sendo capazes de bioconcentrar os xenobióticos, motivos pelos quais eles têm sido largamente utilizados como bioindicadores em programas de avaliação e monitoramento da qualidade da água (Sheehan & Power 1999, Porte et al. 2001).

Uma das espécies de bivalves de maior ocorrência na costa brasileira é o mexilhão *Perna perna*. Além de ser uma espécie adequada para estudos de monitoramento ambiental da zona costeira (Avellar et al. 2000, Bainy et al. 2000), esta espécie serve como uma importante fonte nutricional através da exploração de seus estoques naturais ou da produção de fazendas de mitilicultura, particularmente no estado de Santa Catarina (Barraco et al. 1999, da Silva et al. 2002). Assim, as características que tornam o *P. perna* uma sentinela ambiental, podem comprometer a qualidade de sua carne como fonte alimentar, através do acúmulo de compostos tóxicos em seus tecidos, oferecendo riscos à saúde humana (Wooton et al. 1995, Barraco et al. 1999).

Os bivalves são resistentes à presença de compostos tóxicos, sendo capazes de sobreviver e reproduzir em ambientes contaminados (Smital & Kurelec 1998a, Sheehan & Power 1999). Uma das respostas celulares ativadas pelo estresse químico envolve a indução do mecanismo MXR (multixenobiotic resistance, resistência múltipla a xenobióticos). Este mecanismo, descrito pela primeira vez em organismos aquáticos por Kurelec (1992), envolve o aumento na expressão de uma proteína transportadora de membrana de aproximadamente 170 kDa, denominada glicoproteína P (Pgp, P-170 ou

multidrug transport protein) que se liga ao xenobiótico e facilita o seu efluxo através de um processo passível de saturação, dependente de energia, prevenindo, assim, o acúmulo no meio intracelular e o estabelecimento de possíveis efeitos tóxicos (Cornwall et al. 1995).

Ensaio de acúmulo *in vivo* de Rodamina B (ROD) foram utilizados para demonstrar o aumento na atividade da Pgp em populações naturais de organismos expostos à poluição e em animais expostos a xenobióticos sob condições laboratoriais (Bard 2000, Kurelec et al. 2000). A estimativa da atividade do transportador é feita através da comparação do acúmulo de ROD no meio intracelular, na presença e na ausência do inibidor competitivo verapamil (VER) (Cornwall et al. 1995, Epel 1998, Kurelec et al. 2000). O acúmulo da ROD na presença e na ausência de VER fornece um índice de atividade de transporte das proteínas do tipo Pgp (Epel 1998).

Esta técnica foi modificada para avaliar a influência do óleo diesel sobre a atividade de transporte via Pgp em mexilhões *Perna perna* coletados nas balsas do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM-UFSC) localizado na Praia do Sambaqui (Lemos et al. 2003a, submetido) e analisar o mecanismo MXR em animais após terem sido transferidos de uma zona de cultivo, para um local com suspeita de contaminação por esgoto doméstico (Lemos et al. 2003b, submetido). Estes estudos mostraram variações significativas dependendo do local de origem dos animais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade do mecanismo MXR em populações de *P. perna* coletados em diferentes ambientes da Ilha de Santa Catarina-SC, Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta dos mexilhões.**

Espécimens de *P. perna*, com tamanho aproximado de 40 mm foram coletados na linha de maré em costões rochosos de três diferentes localidades, na Praia da Joaquina (JQ), na Prainha da Barra da Lagoa (PB) e na Praia do Moçambique (MO). Também foram coletados animais nas balsas de cultivo do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM), UFSC, na Praia do Sambaqui (SM). A localização dos pontos de coleta na Ilha de Santa Catarina - SC pode ser visualizada na figura 1. As coletas foram efetuadas em 2001, 2002 e 2003. Em alguns experimentos foram adotados períodos breves de depuração, em que os animais foram previamente mantidos no laboratório. Em todos os outros ensaios, logo após as coletas, os animais foram transportados para o laboratório e imediatamente utilizados para a avaliação *in vivo* da atividade da Pgp.

### **Ensaio de transporte da ROD *in vivo*.**

Os ensaios *in vivo* foram efetuados através de adaptações do protocolo proposto por Kurelec et al. (2000). Após cada ensaio, 0,14 g de brânquia de cada espécimen foi retirada, rapidamente lavada e homogeneizada em 1 mL de água destilada. As amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 7 min e a fluorescência do sobrenadante foi quantificada em um fluorímetro (Quantech, modelo FM 109515).

O comprimento total (mm), peso total (g) e sexo de todos os animais analisados foram registrados.

### **Exposição simultânea a ROD e diferentes concentrações de VER**

Em dois experimentos, um realizado com mexilhões coletados em PB e outro com animais na JQ, adotou-se um período de depuração de 12 horas (período máximo). Após tal período, os mexilhões foram divididos em 4 recipientes contendo 500 mL de água do mar filtrada e ROD (1,5  $\mu$ M) (Sigma) ( $n = 4$  por grupo). Ao grupo controle, foi adicionado 50  $\mu$ L de DMSO (veículo de diluição do VER). Foram testadas concentrações nominais de VER iguais a 5, 10 e 20  $\mu$ M (Sigma). Após 2 h de exposição os animais foram analisados.

Nos outros dois experimentos, animais coletados nas mesmas localidades foram avaliados sem depuração. Os mexilhões foram divididos em 6 recipientes contendo 500 mL de água do mar filtrada e ROD (1,5  $\mu$ M) ( $n = 4$  por grupo). Um grupo foi considerado como controle (DMSO) e foram testadas concentrações de VER iguais 5, 10, 15, 20, 40  $\mu$ M. Após 2 h de exposição os animais foram analisados.

### **Exposição simultânea a ROD e VER (20 $\mu$ M).**

Animais das quatro localidades avaliadas (figura 1) foram coletados para realização destes experimentos. Os mexilhões de cada localidade foram divididos em 2 recipientes contendo 500 mL de água do mar filtrada e ROD (1,5  $\mu$ M) ( $n = 4$  por grupo). No recipiente do grupo controle foi adicionado DMSO e no do grupo exposto, foi adicionado VER 20  $\mu$ M. Após 3 h de exposição, os animais foram analisados.

### **Exposição simultânea a ROD e óleo diesel 0,1%.**

Inicialmente foi realizado um experimento em que os mexilhões coletados em PB foram mantidos por 4 horas no laboratório para depuração (período mínimo). Nos experimentos subsequentes, os animais coletados em cada uma das quatro localidades (Figura 1), não foram submetidos a depuração prévia. Os mexilhões foram divididos em 3 recipientes contendo 500 mL de água do mar filtrada e ROD (1,5  $\mu$ M) ( $n = 4$  por grupo), sendo um grupo como controle (DMSO), um grupo controle positivo “inibido” (VER 20  $\mu$ M) e um grupo exposto ao óleo diesel (0,1%). Após 3 h de exposição, os animais foram analisados.

### **Exposição simultânea a ROD e diferentes concentrações de óleo diesel**

Os mexilhões coletados em PB, MO e no cultivo em SM, foram divididos em 6 recipientes contendo 500 mL de água do mar filtrada e ROD (1,5  $\mu$ M) ( $n = 4$  por grupo). Os grupos foram divididos em controle, contendo DMSO, grupo inibido com VER 20  $\mu$ M, e 4 grupos contendo concentrações crescentes de óleo diesel 0,001%, 0,01%, 0,1% e 0,5%. Após 3 h de exposição, os animais foram analisados.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos durante os ensaios foram submetidos a um teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a aderência a normalidade. Neste caso, as diferenças entre os tratamentos foram analisadas aplicando-se uma análise de variância de uma via, com nível de significância igual a  $P \leq 0,05$ . Adotou-se o

desvio padrão como medida de dispersão. Comparações Post-Hoc foram realizadas através do teste Tukey HSD para grupos de mesmo tamanho amostral. Dados que não aderiram à distribuição normal foram comparados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas não paramétricas (Zar 1984, Sokal & Rohlf 1994).

### 3. Resultados

Nos experimentos de exposição a ROD e diferentes concentrações de VER, em que os animais coletados em PB foram aclimatados por 12 horas, não foram observadas diferenças significativas no acúmulo de ROD entre os animais expostos a 5  $\mu\text{M}$  de VER e os animais controle (DMSO). Os animais que permaneceram em 10 e 20  $\mu\text{M}$  de VER acumularam aproximadamente 2 vezes menos ROD nas suas brânquias que os animais mantidos em 5  $\mu\text{M}$  (figura 2A). Nos experimentos em que animais coletados em JQ foram aclimatados por 12 horas, os mexilhões expostos a 5 e 10  $\mu\text{M}$  VER acumularam, respectivamente, 1,4 vezes e 1,77 vezes mais ROD em suas brânquias que os animais controle. Os animais mantidos nas concentrações de 20 e 25  $\mu\text{M}$  VER não apresentaram diferença no acúmulo de ROD em relação ao controle (figura 2B).

Animais coletados na PB e imediatamente expostos a ROD e diferentes concentrações de VER, sem terem sido aclimatados ao laboratório apresentaram uma diminuição significativa do acúmulo de ROD, nas maiores concentrações de VER. Apenas os mexilhões expostos a 5  $\mu\text{M}$  de VER não apresentaram alterações significativas no acúmulo de ROD em relação aos animais controle (figura 3A). Por outro lado, os animais coletados na JQ e que não foram aclimatados, acumularam mais ROD em suas brânquias que os animais controle, nas diferentes concentrações de VER (figura 3B).

Os mexilhões coletados em JQ e em MO, expostos a ROD e VER (20  $\mu\text{M}$ ) acumularam aproximadamente 2 vezes mais ROD que o grupo controle e os animais de SM, acumularam 4 vezes mais (figura 4). Os animais de PB não apresentaram diferenças significativas no acúmulo de ROD em relação ao

grupo controle. Ao se comparar o acúmulo de ROD nos animais controle (DMSO) das diferentes localidades, foi observado que os animais de SM acumularam aproximadamente 3 vezes menos ROD que os animais coletados em PB e em JQ (figura 4).

Realizou-se um experimento inicial de exposição a ROD e óleo diesel 0,1%, em que animais coletados em PB foram submetidos a um período de depuração de 4h. Não foram observadas alterações nas taxas de acúmulo de ROD entre os animais controle e os animais expostos ao óleo. Já no grupo exposto ao VER, o acúmulo de ROD foi 6,55 vezes menor que o dos animais controle (figura 5A). Um experimento similar foi realizado com animais coletados nas 4 localidades avaliadas, sem aclimatação. Nos mexilhões de JQ foi observado um aumento (1,45 vezes) no acúmulo de ROD apenas no grupo exposto a VER (figura 5B). Nos animais de MO não foram observadas alterações no acúmulo de ROD nos animais expostos a VER ou óleo diesel. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos nos animais coletados em SM. Os animais de PB expostos a VER e óleo diesel acumularam cerca de 2 vezes mais ROD nas brânquias que os animais controle (figura 5B). Comparando-se o acúmulo de ROD entre os grupos controle dos diferentes locais, pode-se observar que os animais de MO acumularam 2,3 vezes mais ROD que os animais de PB e 1,82 vezes mais ROD que os animais de SM (figura 5B).

Nos experimentos de exposição simultânea a ROD e diferentes concentrações de óleo diesel (figura 6), os animais coletados em SM e em PB não apresentaram alteração no acúmulo de ROD nas diferentes concentrações de óleo diesel testadas. Os mexilhões tratados com VER se comportaram de

maneiras diferentes nas duas localidades. Os animais de SM apresentaram um acúmulo de ROD 6,32 vezes menor que o controle, e os de PB, não tiveram alteração neste acúmulo. Nos animais coletados em MO, a presença do óleo parece não influenciar a taxa de acúmulo da ROD, a não ser por uma diminuição de 1,64 vezes nos animais expostos a 0,01% de óleo em relação ao controle. Quando se compara o acúmulo de ROD nos grupos controle das diferentes localidades, não são encontradas diferenças significativas, apesar do acúmulo de ROD nos animais de MO ser 2,1 vezes maior que nos animais de SM (figura 6).

#### 4. Discussão

A maior fonte de contaminação dos ecossistemas costeiros na Ilha de Santa Catarina é através do lançamento de esgotos domésticos. Os pontos de coleta analisados neste estudo foram estabelecidos de acordo com o impacto humano sobre o ambiente. A Praia do Moçambique (MO) está situada em uma área de preservação ambiental sendo, portanto, considerada como não impactada. A Praia da Joaquina (JQ) foi considerada como pouco impactada, pois, apesar do grande número de turistas que a visitam, aparentemente não recebe o aporte direto de esgoto doméstico não tratado. A Prainha da Barra da Lagoa (PB), localizada próxima ao canal que liga a Lagoa da Conceição ao mar, foi analisada por sofrer a influência da liberação do esgoto que ocorre na Lagoa da Conceição e no canal da Barra. Os mexilhões da zona de cultivo foram coletados na Praia do Sambaqui (SM), que aparentemente não sofre um grande impacto antropogênico.

Dependendo do grau de contaminação alguns organismos aquáticos podem se adaptar ao ambiente através do mecanismo MXR. Este mecanismo possui duas características como biomarcador de contaminação aquática, a sua indução na presença de xenobióticos e a capacidade que algumas substâncias, denominadas quimiossensibilizadores, apresentam de bloquear o transporte da Pgp, revertendo assim este mecanismo inerente de resistência para um estado de sensibilidade patobiológica (Kurelec 1997, Kurelec et al. 1998, Smital & Kurelec 1998a, Smital & Kurelec 1998b, Bard 2000). Em estudos anteriores foi identificada a expressão de uma proteína relacionada a Pgp na brânquia de *P. perna* (Bresolin & Bainy 2000, Lemos et al. 2003a, Lemos et al. 2003b).

No presente estudo, os mexilhões apresentaram três padrões de comportamento distintos em relação à atividade da Pgp. Primeiramente os animais controle acumularam uma concentração de ROD em torno de 25 ( $\mu\text{g}/\mu\text{g tecido}$ ). $10^{-4}$  e os mexilhões na presença de VER, apresentaram um acúmulo significativamente maior. O segundo grupo foi formado por animais controle que acumularam uma concentração relativamente alta de ROD (maior que 30 ( $\mu\text{g}/\mu\text{g tecido}$ )  $10^{-4}$ ) e animais tratados com VER que não alteraram o seu acúmulo em relação a média dos animais controle. Um terceiro grupo apresentou animais controle que acumularam uma concentração de ROD semelhante ao segundo grupo, mas que diminuíram o acúmulo de ROD na presença de VER.

Estudos efetuados para testar o potencial de inibição do mecanismo MXR, de certos compostos químicos, estabeleceram uma faixa de concentração de substrato ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M  $\text{L}^{-1}$ ) em que é possível observar a inibição do transporte pela presença do VER; acima de  $5 \times 10^{-6}$  M  $\text{L}^{-1}$  de substrato o VER não ocasionaria nenhum efeito aparente na atividade da Pgp, sugerindo a saturação da capacidade de bombeamento do transportador (Epel 1998).

Os animais oriundos da JQ comportaram-se de acordo com o primeiro padrão de atividade da Pgp em três experimentos distintos. Quando os animais foram depurados por 12 horas e expostos às concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  de VER (figura 2B); quando animais não depurados foram expostos a diferentes concentrações de VER (5 – 40  $\mu\text{M}$ ) (figura 3B) e; quando animais não depurados foram expostos a 20  $\mu\text{M}$  de VER (figura 4 e figura 5B). Os mexilhões coletados em MO mostraram comportamento similar ao serem

expostos a 20  $\mu$ M de VER sem depuração (figura 4 e figura 6). Os animais provenientes da zona de cultivo em SM, também transportaram eficientemente a ROD na ausência de VER (controle), mostrando uma maior atividade quando comparados com as outras localidades (figura 4). Os animais provenientes de PB comportaram-se de maneira similar, ao serem expostos a 20  $\mu$ M de VER (figura 5).

O padrão 2 foi observado nos animais coletados em JQ, nos ensaios em que foram depurados durante 12h e posteriormente expostos a 20  $\mu$ M de VER (figura 2B). Nos mexilhões coletados em PB ao serem expostos à concentração de 5  $\mu$ M de VER, após uma depuração de 12h (figura 2A), ao serem expostos à concentração de 5  $\mu$ M de VER, sem depuração (figura 3A) e ao serem expostos a 20  $\mu$ M de VER, sem depuração (figura 4 e figura 6). Os mexilhões coletados na área de cultivo de SM tiveram comportamento similar ao serem expostos a 20  $\mu$ M de VER, sem depuração (figura 5B). Da mesma forma, que os animais coletados em MO (figura 5B).

O padrão 3 de comportamento foi observado nos animais coletados em PB, nos experimentos em que os animais foram depurados por 12 h e então expostos a 10 e 20  $\mu$ M de VER (figura 2A) e nos experimentos em que não foram depurados, quando expostos a 10-40  $\mu$ M (figura 3A) e quando expostos a 20  $\mu$ M (figura 5A). Da mesma forma que os animais coletados em SM, quando expostos a 20  $\mu$ M (figura 6).

Baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios em que foram efetuadas curvas de concentração de VER, pode-se propor que os três padrões de comportamento observados refletem o status do transportador na seguinte ordem crescente de saturação:

Padrão 1) indica a ausência de saturação do MXR, observado nos animais coletados em JQ, com depuração de 12h em que 5 e 10  $\mu\text{M}$  de VER inibem o transporte (figura 2B) e sem depuração, com todas as concentrações testadas inibindo o transporte (figura 3B). Neste caso, o transporte da Pgp foi considerado eficiente, já que na ausência de competição pela ligação (controles), o acúmulo de ROD é significativamente menor (Epel 1998, Kurelec et al. 2000).

Padrão 2) indica a saturação da capacidade de bombeamento da Pgp, tendo sido observado nos mexilhões coletados em PB, que acumularam ROD nas brânquias de maneira similar ao grupo controle, ao serem expostos a 5  $\mu\text{M}$  de VER (figuras 2A e 3A). A aparente insensibilidade à exposição ao VER, com os grupos expostos e controles acumulando concentrações similares de ROD, pode indicar, que o transporte via Pgp esteja saturado (Epel 1998), com os sítios de ligação das proteínas ocupados por substratos antes da execução dos ensaios.

Padrão 3) também indica a saturação do sistema, parece, no entanto, indicar uma situação potencialmente mais estressante, já que com o aumento da concentração de VER testada (10 – 40  $\mu\text{M}$ ), observou-se à diminuição do acúmulo em comparação com os animais controle (figuras 2A e 3A). O VER, além de inibidor competitivo modelo, é um conhecido bloqueador de canais de cálcio, causando estresse hiposmótico em mexilhões *Perna perna* (Stucchi-Zucchi & Salomão 1998, Ferreira & Salomão 2000). Se o sistema de transporte não conseguir bombear o VER eficientemente, pode ocorrer um aumento significativo na concentração no meio intracelular, acarretando em modificações na permeabilidade das

brânquias relacionadas com a osmoregulação. Epel (1998) sugere que este padrão de comportamento esteja relacionado com a indução de um outro tipo de transportador que não a Pgp.

Em função destes dados, propõe-se que ao se adotar esta técnica para avaliação dos níveis de indução do MXR em uma espécie, seja necessária uma avaliação prévia, através do teste de curvas de concentração, para estabelecimento de qual a melhor concentração de VER a ser adotada nos ensaios *in vivo* de acúmulo de ROD, pois a incubação com diferentes concentrações de VER causam respostas diferenciadas dentro de uma mesma espécie e entre espécies diferentes.

A partir dos resultados obtidos na curva de VER, efetuada com animais provenientes de JQ e não aclimatados (figura 3B), adotou-se a concentração nominal de 20  $\mu$ M de VER, para exposição dos mexilhões nos ensaios seguintes (grupo inibido, figuras 4, 5 e 6), partindo-se do pressuposto que esta concentração é capaz de inibir o transporte da Pgp.

Em todas as localidades, ao longo dos dois anos em que foram efetuadas as coletas, foram observados momentos em que os animais transportaram eficientemente a ROD e momentos em que a capacidade de bombeamento da Pgp parecia saturada. A frequência em que estes padrões foram observados para cada localidade, parece se relacionar com o impacto humano aparente, conforme definido inicialmente na escolha dos pontos de coleta. Os animais foram capazes de transportar eficientemente a ROD em 50% dos ensaios que utilizaram mexilhões coletados em JQ, 33% dos ensaios que utilizaram animais provenientes de MO, 33% dos ensaios que utilizaram animais provenientes da área de cultivo em SM e em apenas 16% dos ensaios

com mexilhões provenientes de PB. O padrão de comportamento do tipo 3, que se considerou como potencialmente mais estressante, foi observado apenas nos animais coletados em PB e SM, em 50% e 33% dos ensaios, respectivamente.

A saturação do MXR já foi relacionada à presença no ambiente de quimiossensibilizadores, substâncias tóxicas e não-tóxicas (naturais ou sintéticas) que sejam substratos para o transporte da Pgp (Kurelec et al. 1998b). Tais substâncias são consideradas entre os primeiros, na escala de poluentes mais perigosos para os ecossistemas aquáticos (Kurelec, 1997, Kurelec et al. 1998, Smital & Kurelec 1998b, Kurelec et al. 2000, Bard 2000). A sua presença no ambiente altera os aspectos ecotoxicológicos dos xenobióticos, exercendo profunda influência sobre parâmetros, tais como: exposição, captação, dose interna, bioacumulação, resposta, sinergismo e toxicidade (Kurelec et al. 1998, Britvic & Kurelec 1999).

Dentre as substâncias que conhecidamente possuem potencial para reverter o MXR, constam: toxinas naturais (extraídas de bactérias, algas e protozoários) ingeridas através da alimentação por organismos filtradores (Keppler & Ringwood 2001, Epel 1998), compostos orgânicos presentes na água de locais poluídos e não-poluídos, além de xenobióticos, como o benzo(a)pireno e hidrocarbonetos derivados do petróleo, por exemplo (Kurelec et al. 1998, Bard 2000).

Desta forma, sem uma análise da água dos locais de coleta, pode-se apenas especular que a maior frequência de saturação do MXR, observada em PB e em uma frequência menor em SM, deve estar relacionada com um aumento na concentração de matéria orgânica no ambiente, conforme proposto

por Kurelec et al. (1998) e observado por Lemos et al. (2003b), para esta mesma espécie, onde foi possível estabelecer uma correlação positiva entre a saturação da capacidade de bombeamento da Pgp e o aumento na turbidez observada na área de cultivo de SM, no dia em que se efetuou a coleta dos mexilhões.

Embora não seja possível afirmar qual a natureza do aumento na concentração de compostos orgânicos na água em PB e SM, se foi decorrência de variações naturais (aumento no índice pluviométrico, proliferação de algas, etc), ou se foi devido à ação antrópica, através da contaminação com esgoto doméstico, deve-se salientar que a saturação do transportador Pgp acarreta em um aumento do efeito tóxico. Experimentos anteriores realizados com o bivalve de água doce *Corbicula fluminea* mostraram que o efeito genotóxico dos aminoantracenos (AA) foi aumentado pela presença de moduladores do MXR (Waldmann et al. 1995). Mexilhões de água doce *Dreissena polymorpha* expostos a 2-aminofluoreno (AF) e benzo(a)pireno (B(a)P) apresentaram um aumento na produção de metabólitos mutagênicos quando expostos a água de um rio conhecidamente poluído (Britvic & Kurelec 1999).

Além dos 3 padrões de comportamento observados, que possivelmente refletem diferenças qualitativas relacionadas as condições do ambiente nas quatro localidades no momento da coleta, observou-se que os mexilhões provenientes destes locais apresentaram diferenças em relação ao nível de indução do mecanismo MXR. Animais com o transporte da Pgp mais ativo devem acumular uma menor quantidade de ROD nas brânquias na ausência de competição. Sendo assim, comparou-se o acúmulo de ROD nos grupos controle e aparentemente os animais coletados em SM (figuras 4 e 5) e PB

(figura 4) apresentaram uma tendência de menor acúmulo quando comparados aos animais coletados em JQ (figura 4) e MO (figura 5). Para que o nível de indução do MXR possa ser utilizado como biomarcador de susceptibilidade a contaminação, em indivíduos ou populações, é importante que haja um conhecimento prévio de variações na expressão do MXR interindividuais e interpopulacionais existentes naturalmente (Smital & Kurelec 1998, Kurelec et al. 2000).

Alguns pesquisadores utilizam o padrão de acúmulo de ROD na presença de VER, expresso em equivalente  $\mu\text{M}$  VER, como uma unidade para medir o potencial inibitório do mecanismo MXR, de xenobióticos ou de amostras ambientais (Kurelec et al. 1998). Da mesma maneira, no presente estudo, o comportamento dos animais na presença de VER foi utilizado como ponto de partida para interpretar os dados obtidos através da exposição ao óleo diesel comercial.

De maneira geral, o potencial inibitório do óleo diesel parece ser menor que o apresentado pelo VER, pois na maioria dos ensaios realizados, os animais expostos ao óleo diesel não mostraram uma alteração aparente no acúmulo de ROD em comparação com o grupo controle. Isto foi observado nos animais coletados em PB que foram submetidos a depuração durante 4h (figura 4), nos mexilhões provenientes de JQ, de MO e de SM, não depurados (figura 5) e nos mexilhões coletados em PB, em MO e em SM (figura 6). Nenhuma das diferentes concentrações de óleo diesel testadas, parecem causar inibição no transporte da Pgp. Apenas os mexilhões coletados PB, que foram expostos ao óleo diesel 0,1%, mostraram um acúmulo 2 vezes maior de ROD que o grupo controle (figura 5).

Considera-se que o óleo diesel seja substrato para o transporte via Pgp, pois em estudos efetuados por Smital & Kurelec (1998), o óleo diesel induziu o MXR (aumentando a atividade da Pgp) em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* após três dias de exposição e em estudos efetuados por Haumdoum et al. (2002), foi observado que a fração solúvel em água do óleo diesel biodegradado é capaz de aumentar o acúmulo de ROD em embriões de *Urechis caupo*. Desta maneira, a aparente ausência de resposta dos animais expostos ao óleo diesel, no presente estudo, pode estar relacionada a uma menor sensibilidade do mexilhão *Perna perna* a este composto quando comparado com os invertebrados aquáticos utilizados nos estudos citados. Diferenças interespecíficas em relação à sensibilidade a xenobióticos, já foram correlacionadas a diferenças no nível inerente de Pgp apresentado pelas espécies (Smital & Kurelec 1998, Bard 2000, Haumdoum et al. 2002).

Diferentes períodos de depuração prévia (4 e 12h) ou a ausência de depuração, foram adotados como forma de testar a influência que a permanência ou não em um ambiente sem xenobióticos exerce sobre a avaliação da atividade da Pgp. Segundo o protocolo proposto por Kurelec et al. (2000), os ensaios de acúmulo de ROD devem ser executados no mesmo dia em que os mexilhões foram coletados, mas não sem antes depurá-los por no mínimo 4 horas, para que os substratos presentes no ambiente, possam se desligar do transportador Pgp. Os períodos foram considerados como 12 h tempo máximo depuração e 4 h tempo mínimo para depuração.

Os resultados indicam que, pelo menos para os animais coletados em PB, os períodos testados não foram suficientes para a liberação dos substratos (figuras 2A e 5A). Os animais aclimatados apresentaram o transporte saturado,

de maneira similar ao observado para os mexilhões que não foram submetidos a depuração (figura 3A). Para os animais provenientes de JQ, o período de depuração parece exercer alguma influência sob a eficiência do transporte de ROD, com os animais depurados (12h) mostrando o transporte saturado na concentração de 20  $\mu\text{M}$  de VER (figura 2B) e os mexilhões não depurados mostrando uma inibição significativa do transporte até a concentração de 40  $\mu\text{M}$  de VER (figura 3B). O maior acúmulo de ROD no grupo controle de animais depurados (figura 2B) pode ter relação com a permanência no laboratório ou apenas refletir diferenças nas condições ambientais em JQ, existentes nos dois dias de coleta. Os experimentos subseqüentes foram realizados sem depuração prévia dos animais, baseando-se nos resultados discutidos acima e em dados obtidos em experimentos anteriores (Lemos et al. 2003a).

A partir dos resultados obtidos em todos os ensaios, as seguintes conclusões foram retiradas:

- 1) a eficiência de transporte de ROD em cada população avaliada, variou nos diferentes dias de coleta, possivelmente refletindo variações temporais nas condições ambientais, tais como turbidez da água, concentração de clorofila e concentração de compostos tóxicos naturais ou feitos pelo homem, nestas localidades;
- 2) diferenças em relação ao nível de indução do mecanismo MXR, nos mexilhões das quatro localidades, também foram observadas;
- 3) foi observado que diferentes concentrações de VER ocasionam diferentes padrões de comportamento. Assim, propõe-se que para uma avaliação mais criteriosa da dinâmica do transporte da Pgp adote-se pelo menos duas concentrações (10 e 20  $\mu\text{M}$ , por exemplo) de VER;

5) os mexilhões *Perna perna* mostraram uma resistência maior a exposição ao óleo diesel comercial quando comparados a outras espécies já avaliadas, já que aparentemente, o transporte da Pgp não é inibido pela presença de (0,0001 – 0,5%) de óleo na água;

6) os mexilhões da espécie *Perna perna* podem sofrer de estresse hiposmótico em função da exposição ao VER. Desta maneira propõe-se que para realização dos ensaios de acúmulo *in vivo*, seja efetuada uma avaliação prévia, utilizando-se o VER (inibidor modelo) e outro inibidor do transporte da Pgp que não cause este efeito colateral.

## 5. Referências Bibliográficas

Avelar, W.E.P., Mantelatto, F.L.M., Tomazelli, A.C., Silva, D.M.L., Shuhama, T. and Lopes, J.L.C. 2000. **The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil.** *Water, Air, Soil Pollution*, **118**, 65 –72.

Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C. and Medeiros, I.D. 2000. **Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil.** *Marine Environmental Research*, **50**, 411-416.

Bard, S. M. 2000. **Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms.** *Aquatic Toxicology*, **48**, 357-389.

Barracco, M. A., Medeiros, I. D. and Moreira, F. M. 1999. **Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*.** *Fish and Shellfish Immunology*, **9**, 387-404.

Bresolin, T. and Bainy, A. C. D. 2000. **Detection of Pgp-like proteins in the mussel *Perna perna*.** *Res. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular – SBBQ*.

Britvic, S., Kurelec, B. 1999. **The effects of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in waters spiked with premutagens.** *Aquatic Toxicology*, **47**, 107-116.

Cornwall, R, Toomey, B.H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W.M. and Epel, D. 1995. **Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills**

**of *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates.** *Aquatic Toxicology*, **31**, 277-296.

Epel, D. 1998. **Use of multidrug transporter as first lines of defense against toxins in aquatic organisms.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, **120** (A), 23-28.

Ferreira, R. P. and Salomão, L. C. 2000. **The ionic basis of cardiac activity in the bivalve mollusc *Perna perna*.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **249**, 1-12.

Haumdoum, A. M.; Griffin, F. J. and Cherr, G. N. 2003. **Tolerance to biodegraded oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter.** *Aquatic Toxicology*, **61**, 127-140.

Keppler, C. and Ringwood, A. H. 2001. **Expression of P-glycoprotein in the gill of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects.** *Aquatic Toxicology*, **54**, 195-204.

Kurelec, B. 1992. **The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organism.** *Critical Reviews in Toxicology*, **22**, 23-43.

Kurelec, B. 1997. **A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance.** *Environmental Health Perspectives*, **105**(4), 855-860.

Kurelec, B., Britvic, S., Pivceviac, B. and Smital, T. 1998. **Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment.** *Marine Environmental Research*, **46**, 415-419.

Kurelec, B., Smital, T., Pivčeviač, B., Eufemia, N. and Epel, D. 2000. **Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers.** *Ecotoxicology*, **9**, 307-327.

Lemos, P. M. M., Trivella, D. B. B., Bressolin, T., Ventura, E. C., Marques, M. R. F. and Bainy, A. C. D. 2003 (a). **Analysis of multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in mussel *Perna perna* exposed to diesel oil.** *Marine Ecology Progress Series* (submetido).

Lemos, P.M.M., Trivella, D.B.B., Bressolin, T., Xavier, A.L.R., Zanette, J., Ferreira, J.F., Bainy, A.C.D. and Marques, M.R.F. 2003 (b). **Biomarker response in mussel, *Perna perna*, transplanted to a contaminated site at Santa Catarina Island, Brazil.** *Marine Research* (submetido)

Porte, C., Biosca, X., Solé, M. and Albaigés, J. 2001. **The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress protein in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain).** *Environmental Pollution*, **112**, 261-268.

Sheehan, D., Power, A. 1999. **Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, **123** (C), 193-199.

da Silva, P. M., Magalhães, A. R. M. and Barraco, M. A. 2002. **Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Buchephalidae) on *Perna perna* mussels from a cultured station in Ratoles Island, Brazil.** *Journal of Invertebrate Pathology*, **79**, 154-162.

Smital, T. and Kurelec, B. 1998 (a). **The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure.** *Marine Environmental Research*, **46** (15), 443-447.

Smital, T. and Kurelec, B. 1998 (b). **The chemosensitizer of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants.** *Mutation Research*, **399**, 43-53.

Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. (Freeman & Company). 1994. **Biometry.** (3<sup>rd</sup> Ed., New York, USA).

Stucchi-Zucchi, A. and Salomão, L. C. 1998. **The ionic basis of membrane potentials and adaptation to hyposmotic stress in *Perna perna*, na osmoconforming mollusc.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, **121** (A), 143-148.

Waldmann, P., Pivceviac, B., Müller, W. E. G., Zahn, R. K. and Kurelec, B. 1995. **Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with fresh water clam *Corbicula fluminea*.** *Mutation Research*, **342**, 113-123.

Wootton, A.N., Herring, C., Spry, J.A., Wiseman, A., Livingstone, D.R. and Goldfarb, P.S. 1995. **Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp.** *Marine Environmental Research*, **39**, 21-26.

Zar, J.H. (Prentice-Hall). 1994. **Biostatistical Analysis**, (Englewood Cliffs).

## Capítulo 4

**Aplicação da técnica de ddPCR (*differential display PCR*) em mexilhões**

***Perna perna* (L.) (Bivalvia, Mytilidae) expostos ao óleo diesel (0,1%)**

Lemos, P. M. M.; Severino, P.; Terenzi, H., Marques, M. R. & Bainy, A. C. D.

Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina,  
Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil

### **Abstract**

*The aim of this work was to identify differences in gene expression pattern in mussels *Perna perna*, exposed to diesel oil through the method of ddPCR (differential display PCR), a simple, sensitive and reproducible method. However, in the present study no clear change in gene expression pattern could be observed. The major pitfalls were due to the selection of adequate primers, optimization of ddPCR conditions, product detection methods and large number of false positives. Despite these problems, this methodology can be used as auxiliary tool in ecotoxicological studies.*

## Resumo

*O presente trabalho visou a detecção das possíveis alterações no padrão de genes expressos nos mexilhões *Perna perna*, após a exposição ao óleo diesel. A técnica utilizada para a obtenção de tais informações foi a ddPCR (differential display PCR), considerada por muitos autores, um método simples, rápido, sensível e reprodutível. Entretanto neste estudo não foi possível identificar a expressão diferencial de genes nestes animais. Os maiores obstáculos apresentados foram a escolha de iniciadores adequados, otimização das condições da ddPCR, detecção dos produtos obtidos e grande número de resultados falso positivos. Apesar de todas estas dificuldades, a técnica tem potencial de ser utilizada como ferramenta auxiliar em estudos ecotoxicológicos.*

## 1. Introdução

Os problemas com a poluição ao longo da costa do Brasil têm se agravado nos últimos 50 anos, principalmente em função da ocupação desordenada do litoral, com aproximadamente metade da população habitando a menos de 200 km do mar (Brasil MMA - Ministério do Meio Ambiente, 1996). O surgimento nesta região, de grandes cidades e de pólos industriais importantes, que na maioria das vezes não apresentam nenhuma forma de planejamento físico ou de gestão dos dejetos produzidos pelos seus cidadãos, causou uma degradação crescente dos ambientes marinhos e estuarinos (CNIO, 1998). Em termos quantitativos, o óleo cru pode ser considerado o poluente orgânico mais comum nos ecossistemas marinhos. Estima-se que de 1,7 a 8,8 x 10<sup>9</sup> toneladas de hidrocarbonetos derivados do petróleo são liberados nos ecossistemas marinhos anualmente (Head & Swannell, 1999). São poucos os dados resultantes de estudos ecotoxicológicos efetuados especificamente com o óleo diesel. Apesar disso sabe-se, por exemplo, que o óleo diesel é mais tóxico para organismos aquáticos e plantas que o óleo cru (EHC 171, 1996).

A introdução de substâncias ou compostos estranhos à composição natural da água e dos sedimentos aquáticos leva a profundas alterações na biota. A poluição química pode causar uma diminuição na biodiversidade dos ecossistemas, provocando a morte das espécies mais susceptíveis, enquanto outras espécies, que se mostram mais resistentes, tendem a permanecer no ambiente, dominando os nichos ecológicos desocupados e aumentando a sua densidade populacional (Luoma, 1996; English & Kross, 2000; Rocha, 2000).

Nas últimas duas décadas, cientistas têm se dedicado a elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares de proteção e de resistência que possibilitam aos organismos sobreviverem sob condições adversas (Huggett *et al.*, 1992). A exposição dos organismos a compostos tóxicos pode provocar um aumento ou uma diminuição da expressão gênica de modo diferencial para cada composto em função das suas características químicas e da interação com os receptores celulares. Portanto, a determinação de quais genes são expressos pelos organismos, é uma etapa fundamental para a compreensão dos mecanismos de resistência, adaptação e da etiologia das patologias associadas. Avanços recentes permitiram a construção de perfis de transcrição (*transcript profiles*), que avaliam os níveis de expressão de diferentes genes simultaneamente. A utilização de tais técnicas, pode revolucionar a noção atual do impacto antrópico sobre os ecossistemas marinhos, elucidando mecanismos fisiológicos em seu nível molecular (Rhodes & Van Beneden, 1996; Sultan *et al.*, 2000; Jenny *et al.*, 2002).

A técnica utilizada no presente estudo para a obtenção de tais informações foi a *ddPCR* (*differential display polymerase chain reaction*), desenvolvida por Liang & Pardee (1992), que possibilita uma avaliação sensível de toda população de mRNAs transcritos em qualquer tipo celular ou tecido em particular, sob condições específicas em qualquer momento. Para a escolha da técnica, foi levada em consideração principalmente a necessidade de comparação de mais de duas amostras simultaneamente, em função do delineamento experimental adotado (Matz & Lukyanov, 1998).

As vantagens em se utilizar moluscos em estudos sobre alterações na expressão gênica pela exposição a xenobióticos ambientais, têm sido

ressaltadas por diferentes autores, principalmente: pelas características biológicas do animal, que os mantém em contato quase que permanente com o meio circundante, fazendo deles excelentes sentinelas ambientais; pela sua importância ecológica, pois são membros importantes das comunidades bênticas marinhas e estuarinas; e pela importância econômica crescente (Rhodes & Van Beneden, 1996; Van Beneden, Rhodes & Gardner, 1998; Sultan *et al.*, 2000, Jenny *et al.*, 2002).

A técnica de *ddPCR* foi aqui utilizada para avaliação de quais genes têm a sua expressão modificada em função da exposição de mexilhões da espécie *Perna perna* (Bivalvia, Mytilidae) a 0,1% de óleo diesel na água do mar, em condições laboratoriais.

## 2. Material e Métodos

*Mexilhões.* Espécimens adultos de *P. perna* (L.) de ambos os sexos, com comprimento total em torno de 80 mm foram coletados nas balsas do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos LCMM– UFSC, localizado na Praia do Sambaqui, Florianópolis, SC- Brasil (Figura 1). Os animais foram mantidos por mais de 48 horas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, CCB, UFSC nas seguintes condições: 150 mL de água do mar filtrada por indivíduo (Waldmann et al. (1995) utiliza 160 mL por indivíduo, 16 L com 100 *Corbicula fluminea* de 20 mm; Kurelec et al. (2000) utiliza 10 mL por indivíduo, 100 mL com 10 mexilhões *Mytilus galloprovincialis* de 30-40 mm; Eufemia & Epel (2000) utilizam 100 mL por indivíduo, *Mytilus californianus* ~ 70mm), em salinidade 35 ppm, temperatura 20-25° C e aeração constante. A água era renovada diariamente e durante este período os animais não foram alimentados.

*Exposição ao óleo 0,1% por diferentes tempos.* Os mexilhões foram divididos em dois grupos; o grupo 1 (n=20) foi mantido em recipiente contendo 3 L de água do mar filtrada (AMF) e óleo diesel 0,1% e o grupo 2 (n=20) foi mantido em 3 L de AMF (controles). Após 4, 12 e 24 horas de exposição, quatro indivíduos de cada grupo foram dissecados e os filamentos branquiais retirados, pesados (pelo menos 0,1 g), colocados em criotubos e imediatamente mergulhados em N<sub>2</sub> líquido.

O óleo diesel utilizado durante os ensaios foi adquirido em postos da PETROBRÁS-S.A. A concentração de 0,1% foi escolhida em função dos dados

obtidos em experimentos precedentes do nosso grupo de pesquisa (comunicação pessoal, Bairy & Marques, 2001, Barraco, 2001).

*ddPCR*. O protocolo inicialmente testado se baseou no método proposto por Rhodes & Van Beneden (1996).

*Extração e quantificação do RNA total*. Para extração do RNA total foi utilizado o método proposto para o TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Gaithersburg, MD), reagente composto por uma solução monofásica de fenol e guanidina isocianato que durante a homogeneização do tecido mantém a integridade do RNA, enquanto lisa as células e dissolve os componentes subcelulares. A adição de clorofórmio e posterior centrifugação (10 000 x g, 15 min, 4<sup>o</sup>C) separa a solução em uma fase orgânica e outra aquosa, contendo o RNA total que pode ser recuperado desta solução, através da precipitação com isopropanol. O RNA total obtido foi re-suspendido em 200 µL de água tratada com DEPC 0,01% e armazenado a -80<sup>o</sup> C até a utilização. A quantificação do RNA foi efetuada retirando-se uma alíquota de 10 µL da solução de RNA total diluída em 1 mL de água milliQ, através da leitura da absorbância em 260-280 nm, utilizando-se um espectrofotômetro UV (Ultrospec 3000) (Westermeier *et al.*, 1997). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. As bandas obtidas foram visualizadas em um transiluminador de luz UV. Todas as soluções, vidrarias e o material para eletroforese foram tratadas com DEPC 0,01%, para garantir a eliminação da ação de RNAses presentes no ambiente (Ausubel *et al.*, 1995).

*Tratamento com DNase I* Essencial para a diminuição da frequência dos resultados falso-positivos (falta de consistência no critério de presença/ausência de bandas entre os diferentes tratamentos). Foi utilizado o protocolo proposto pelo fabricante do reagente, Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Life Technologies, Gaithersburg, MD). A DNase I foi inativada com EDTA (25 mM) e o RNA re-precipitado com isopropanol, eliminando assim o EDTA da solução.

*Reação de transcrição reversa* Para a obtenção do cDNA utilizou-se o kit comercial SuperScript™ II H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para cada reação foi utilizado 2 µl de RNA (0,4 µg/µL), 25 µl de 2X tampão para RT, 2 µl do iniciador TTT TTT TTT TMN (0,5 µg/µL), 1 µl de dNTP (100 mM), 1 µl de RT Platinum (5 U/µl) e 20 µl de água tratada com DEPC 0,01%. Os tubos foram mantidos a – 80° C até a utilização.

*Teste do cDNA* Para avaliação da qualidade do cDNA foram efetuadas reações de PCR utilizando-se os iniciadores degenerados:

**ABC 1** (5' GTY GGT TCH TCH GGH TGY GGW AA 3') e

**ABC 2** (5' RTC YAA AGC DGA DGT DGC YTC ATC 3').

Eles amplificam um fragmento de 400 pb do gene que codifica uma proteína similar a glicoproteína P (Pgp) no mexilhão da espécie *Perna perna* (Grimm *et al.*, 2000). Os produtos das PCRs de teste do cDNA foram resolvidos em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. O cDNA em que o fragmento de 400 pb foi amplificado com sucesso, foi considerado de boa qualidade sendo utilizado para a realização da ddPCR.

*Análise da expressão gênica diferencial.* Para a otimização das reações de ddPCR, diferentes condições de força iônica, temperaturas de anelamento e concentrações de dNTPs foram testadas.

#### *Concentração de MgCl<sub>2</sub>*

Foram testadas as concentrações 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 3,0 mM e 5,0 mM de MgCl<sub>2</sub>.

#### *Concentração de dNTP*

Foram testadas as concentrações 3,5 μM; 5 μM, 10 μM e 20 μM de dNTP.

#### *Condições padrão para as PCR*

Utilizou-se 2,5 μL de 10x tampão para PCR (200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl) e 0,2 μL de Taq polimerase (5U/μL). As concentrações de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 20 μM de dNTP foram adotadas como padrão.

*Iniciador de ancoragem.* Dois iniciadores foram testados:

- (1) TTT TTT TTT TMN (0,5 μg/μL)
- (2) Oligo dT (fornecido com o kit comercial SuperScript™ II H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase)

*Iniciadores de sequência arbitrária.* Nas reações de ddPCR iniciais, foram testados os seguintes iniciadores:

- (3) Hexâmeros randômicos (fornecido com o kit comercial SuperScript™ II H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase)
- (4) iniciador H<sub>1</sub> (5' GCT GGC AAG CCA CGTCTTG GTG 3') (5 pmol/μL)
- (5) iniciador H<sub>6</sub> (5' CCG TCT CCG GGA GCT GCA 3') (5 pmol/μL)

Cada iniciador de ancoragem foi testado sozinho ou em conjunto com um dos iniciadores de seqüência arbitrária. Também foi testada a combinação dos iniciadores de seqüência arbitrária, dois a dois.

*Termociclador.* Os diferentes programas que foram testados estão organizados na tabela abaixo:

<b>Programa</b>	<b>Combinação de iniciadores testados</b>
<p><b><u>ddPCR</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 94 °C por 45 s</li> <li>2) 37 °C por 45 s</li> <li>3) 72 °C por 1 min</li> <li>4) repete 3x a partir do passo 1</li> <li>5) 94 °C por 30 s</li> <li>6) 50 °C por 30 s</li> <li>7) 72 °C por 1 min e 30 s</li> <li>8) repete 29x a partir do passo 5</li> <li>9) 15 °C (fim)</li> </ol>	<p>TTT TTT TTT TMN (2,5 µL) + hexâmeros randômicos (2 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + H<sub>1</sub> (2 µL) hexâmeros randômicos (1 µL) + H<sub>6</sub> (1 µL)</p>
<p><b><u>ddPCR (modificado I)</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 94 °C por 45 s</li> <li>→ 2) 35 °C por 2 min</li> <li>3) 72 °C por 1 min</li> <li>4) repete 3x a partir do passo 1</li> <li>→ 5) 92 °C por 30 s</li> <li>→ 6) 40 °C por 40 s</li> <li>→ 7) 72 °C por 2 min</li> <li>8) repete 29x a partir do passo 5</li> <li>9) 15 °C (fim)</li> </ol>	<p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + H<sub>1</sub> (2 µL)</p> <p>hexâmeros randômicos (1 µL) + H<sub>6</sub> (1 µL)</p>

Os iniciadores citados acima não produziram padrões de bandas, foram testadas as modificações na técnica de ddPCR, propostas por Matz & Lukyanov (1998), são elas:

*Iniciadores de seqüência arbitrária mais longos.* ( $\geq 20$  pb). Foram testados os iniciadores:

- OMP 19 (5' CGG ATC CAA RTG GAT HCA YTG YTT 3') (5 µM)
- OMP 41 (5' GTC TAG AGA YGT NGG NCA RMG 3') (5 µM)

- OMP 20 (5' GGA ATT CRT CYT TYT TRT TNA GRA A 3') (5  $\mu$ M)
- RPET 22 (5' CTC AAG CTT CTC TGC TAA GGT GTC ACT CTG 3') (0,2  $\mu$ M)
- FPET 22 (5' GGG GAA TTC CAC CAA GAG TCA CAG CGG AAT G 3') (0,2  $\mu$ M)
- T<sub>7</sub>TER (5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3') (0,2  $\mu$ M)
- FRE 158 (5' GCC CCT CAT ATG ACN AGT CAC AGG GGA ATG 3') (0,5  $\mu$ M)

*Programas do termociclador testados*

<b>Programa</b>	<b>Combinação de iniciadores testados</b>
<p><b><u>ddPCR</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 94 °C por 45 s</li> <li>2) 37 °C por 45 s</li> <li>3) 72 °C por 1 min</li> <li>4) repete 3x a partir do passo 1</li> <li>5) 94 °C por 30 s</li> <li>6) 50 °C por 30 s</li> <li>7) 72 °C por 1 min e 30 s</li> <li>8) repete 29x a partir do passo 5</li> <li>9) 15 °C (fim)</li> </ol>	<p>hexâmeros randômicos (1 <math>\mu</math>L) + FRE 158 (1 <math>\mu</math>L)  H<sub>6</sub> (1 <math>\mu</math>L) + FRE 158 (1 <math>\mu</math>L)  T<sub>7</sub>TER (4 <math>\mu</math>L) + RPET 22 (4 <math>\mu</math>L)</p>
<p><b><u>EDG 2</u></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 95 °C por 5 min</li> <li>2) 93 °C por 30 s</li> <li>3) 65 °C por 30 s (diminuindo 0,5 °C a cada ciclo)</li> <li>4) 72 °C por 1 min</li> <li>5) repete 39x a partir do passo 2</li> <li>6) 95 °C por 30 s</li> <li>7) 45 °C por 30 s</li> <li>8) 72 °C por 1 min</li> <li>9) repete 19x a partir do passo 6</li> <li>10) 72 °C por 10 min</li> <li>9) 4 °C (fim)</li> </ol>	<p>TTT TTT TTT TMN (1 <math>\mu</math>L) + OMP 19 (1 <math>\mu</math>L)  TTT TTT TTT TMN (1 <math>\mu</math>L) + OMP 21 (1 <math>\mu</math>L)  TTT TTT TTT TMN (1 <math>\mu</math>L) + OMP 41 (1 <math>\mu</math>L)  OMP 19 (2 <math>\mu</math>L) + OMP 21 (1 <math>\mu</math>L)  OMP 19 (2 <math>\mu</math>L) + OMP 41 (1 <math>\mu</math>L)  TTT TTT TTT TMN (1 <math>\mu</math>L) + FRE 158 (1 <math>\mu</math>L)</p>

	<p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + RPET 22 (1 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + T<sub>7</sub>TER (1 µL)</p>
<p><b><u>PRI I</u></b></p> <p>1) 50<sup>o</sup>C por 30 s 2) 94<sup>o</sup>C por 2 min 3) 94<sup>o</sup>C por 15 s 4) 55<sup>o</sup>C por 30 s 5) 72<sup>o</sup>C por 1 min 6) repete 39x a partir do passo 3 7) 72<sup>o</sup>C por 5 min 9) 4<sup>o</sup>C (fim)</p>	<p>TTT TTT TTT TMN (2 µL) + RPET 22 (2 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (2 µL) + T<sub>7</sub>TER (2 µL)</p>
<p><b><u>ddPCR (modificado II)</u></b></p> <p>1) 94<sup>o</sup>C por 45 s 2) 35<sup>o</sup>C por 2 min 3) 72<sup>o</sup>C por 1 min 4) repete 3x a partir do passo 1 5) 92<sup>o</sup>C por 30 s 6) 40<sup>o</sup>C por 40 s 7) 72<sup>o</sup>C por 2 min → 8) repete 24x a partir do passo 5 9) 15<sup>o</sup>C (fim)</p>	<p>TTT TTT TTT TMN (4 µL) + FRE 158 (2 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + RPET 22 (2 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + T<sub>7</sub>TER (2 µL)</p> <p>T<sub>7</sub>TER (2 µL)</p> <p>RPET 22 (2 µL)</p>
<p><b><u>ddPCR (modificado III)</u></b></p> <p>1) 94<sup>o</sup>C por 45 s → 2) 45<sup>o</sup>C por 2 min 3) 72<sup>o</sup>C por 1 min 4) repete 3x a partir do passo 1 5) 92<sup>o</sup>C por 30 s → 6) 52<sup>o</sup>C por 40 s 7) 72<sup>o</sup>C por 2 min → 8) repete 24x a partir do passo 5 9) 15<sup>o</sup>C (fim)</p>	<p>TTT TTT TTT TMN (4 µL) + FRE 158 (2 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + RPET 22 (2 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + T<sub>7</sub>TER (2 µL)</p> <p>T<sub>7</sub>TER (2 µL)</p> <p>RPET 22 (2 µL)</p> <p>FRE 158 (2 µL)</p> <p>OMP 19 (1 µL) + OMP 21 (1 µL)</p> <p>OMP 20 (1 µL) + OMP 41 (1 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL) + OMP 20 (1 µL)</p> <p>OMP 20 (1 µL)</p>

<p><b>EDG 3</b></p> <p>1) 95<sup>o</sup>C por 5 min  → 2) 93<sup>o</sup>C por 30 s  → 3) 65<sup>o</sup>C por 30 s  4) 72<sup>o</sup>C por 1 min  → 5) repete 19x a partir do passo 2  6) 95<sup>o</sup>C por 30 s  → 7) 50<sup>o</sup>C por 30 s  8) 72<sup>o</sup>C por 1 min  9) repete 9x a partir do passo 6  10) 72<sup>o</sup>C por 10 min  9) 4<sup>o</sup>C (fim)</p>	<p>OMP 19 (2 µL)  +  OMP 21 (1 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL)  +  OMP 19 (1 µL)  +  OMP 21 (1 µL)</p> <p>TTT TTT TTT TMN (1 µL)  +  FRE 158 (3 µL)</p> <p>FRE 158 (3 µL)</p>
---	---

Os fragmentos de cDNA amplificados foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio. Reações em que apareceram padrões de bandas, tiveram seus produtos resolvidos em géis desnaturantes próprios para sequenciamento, de poli(acrilamida 6% (7M de uréia) (10,5 mL acrilamida/bisacrilamida 40%, 29,4 g uréia, 7 mL TBE 10x, completar até 70 mL com água milliQ. Adicionar 700 µL PSA 10% (persulfato de amônio) e 42 µL de TEMED. A revelação do gel foi efetuada utilizando-se o nitrato de prata (0,001 g/ml de água MilliQ) (Ausubel *et al.*, 1995; Westermeier, 1997).

### 3. Resultados

A integridade do RNA total, extraído dos mexilhões que fizeram parte dos experimentos de exposição ao óleo diesel, pode ser visualizada através de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (Figura 2). Apenas as amostras que estavam em boas condições foram utilizadas nas reações de transcrição reversa, para a obtenção do cDNA.

Após as reações de transcrição reversa, a qualidade do cDNA resultante foi visualizada através de amplificação por PCR. Os produtos destas reações de teste do cDNA foram resolvidos em Gel de agarose a 2% (Figura 3).

Não foram obtidos padrões de bandas nas ddPCR efetuadas utilizando-se os iniciadores de sequência arbitrária, identificados como hexâmeros randômicos, H<sub>1</sub> e H<sub>6</sub>, em nenhuma das combinações testadas.

Após as alterações nos ciclos da ddPCR, foram obtidos padrões de bandas com os seguintes iniciadores:

- OMP 19 + OMP 41 (Figura 4 e 5)
- RPET 22 (Figura 6)
- T<sub>7</sub>TER (Figura 6)
- FPET 22 (Figura 7)
- OMP 20 (Figura 7)

### 3. Discussão

Quando descrita, a *ddPCR* foi considerada um método simples, rápido, sensível, reprodutível, versátil e que utilizava pequenas quantidades de RNA para a obtenção do cDNA. Após a introdução da técnica na rotina de vários laboratórios, alguns pontos foram revistos. Concorda-se quanto à versatilidade e a possibilidade de análise de pequenas quantidades de RNA. Todavia, considerando-se o método como um todo, muitos discordam de sua simplicidade ou rapidez, com opiniões divididas em se tratando da sensibilidade do método e da reprodutibilidade dos padrões de bandas obtidos. Algumas das maiores desvantagens associadas são o grande número de resultados falso-positivos (chegando a 50% das bandas observadas) e o pequeno tamanho dos fragmentos obtidos (Debouck, 1995; Matz & Lukyanov, 1998; Green *et al.*, 2001).

Ao se tentar utilizar esta técnica para avaliar os níveis de expressão gênica em mexilhões da espécie *Perna perna* expostos ao óleo diesel 0,1%, por diferentes tempos, em comparação a animais controle, que permaneceram na água do mar, encontrou-se certa dificuldade.

Alguns cuidados devem ser adotados para minimizar os problemas inerentes a técnica (como alto número de falso positivos e a baixa reprodutibilidade): obtenção de RNA de boa qualidade e em uma concentração que permita a sua análise; garantia de ausência de contaminação com DNA genômico; seleção cuidadosa dos iniciadores a serem utilizados e escolha do método adequado para detecção das bandas e para a separação dos fragmentos obtidos (Debouck, 1995).

A primeira premissa foi cumprida (Figura 2), tendo-se o maior cuidado na manipulação das amostras, desde o momento da coleta, executada com rapidez para melhor preservação das características do tecido o qual era imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Tratamento com DEPC 0,01%, para garantir a eliminação da ação de RNAses presentes no ambiente (Ausubel *et al.*, 1995). O segundo passo, a eliminação da contaminação com DNA genômico, foi garantido com a utilização do tratamento com DNase I, antes da efetuação da reação de transcrição reversa (Rhodes & Van Beneden, 1996).

Quanto a escolha dos iniciadores para efetuação da ddPCR, Rhodes & Van Beneden (1996) propõem: (1) utilização de um iniciador oligo dT em associação com um iniciador não degenerado de 10 pares de bases (10-mer), ou (2) utilização de dois iniciadores 10-mer. Na seleção destes iniciadores (10-mer) deve-se considerar o conteúdo de C+G, que deve se aproximar dos 50%, e a ausência de estruturas que formem grampos (*hairpins*). As duas possibilidades foram testadas no presente trabalho, utilizando-se diferentes iniciadores. Os primeiros iniciadores testados (hexâmeros randômicos, H<sub>1</sub> e H<sub>6</sub>) não produziram padrões de bandas.

Depois que as modificações propostas por Matz & Lukyanov (1998), foram introduzidas, padrões de bandas em 5 diferentes combinações de iniciadores foram obtidos (figuras 4 a 7). No entanto, não foram observadas bandas diferentemente expressas presentes nos 4 animais analisados por tratamento. Foram observadas algumas diferenças individuais nas bandas obtidas, não tendo sido correlacionadas ao tratamento. Não se sabe ao certo se o problema encontra-se nos próprios iniciadores escolhidos, que não se

mostraram adequados para a técnica, ou se as condições da ddPCR que foram testadas não satisfizeram as necessidades da técnica.

A avaliação da utilização de outros iniciadores e a otimização das condições da ddPCR, utilizando-se os iniciadores que já haviam produzido padrões de bandas, foi prejudicada pelas dificuldades enfrentadas na utilização da coloração com nitrato de prata (figura 6A e 6C). A resolução em gel de agarose com coloração através do brometo de etídeo, não tem a sensibilidade necessária para a observação das bandas da ddPCR (de 90 a 95% dos transcritos está representado por menos de 5 cópias por célula) (Green *et al.*, 2001).

O método mais adequado para a separação dos fragmentos e para a visualização dos produtos de ddPCR é a eletroforese utilizando géis desnaturantes (7M de uréia) de poli(acrilamida normalmente utilizados para o sequenciamento, corados com nitrato de prata (Liang & Pardee, 1992; Shen & Green, 1998; Mahadeva *et al.*, 1998; Jurecic & Belmont, 2000), pois a utilização de géis de agarose corados com brometo de etídeo está restrita a identificação da presença das bandas, já que devido ao seu baixo nível de detecção, a identificação sistemática da maioria dos mRNAs fica dificultada (Figura 4A e Figura 7). Mesmo o uso do PAGE corado com nitrato de prata pode não ser sensível o bastante para detectar as alterações que geralmente ocorrem na expressão gênica, já que seu limite de detecção permite visualizar diferenças de no mínimo 100 vezes a concentração de mRNA; falhando em mostrar o nível mais comum de alteração na expressão gênica, que é de aproximadamente 10 vezes a concentração de mRNA, segundo estudos de *microarray* (Ranamukhaarachchi *et al.*, 2002).

Na tentativa de se solucionar os problemas com a coloração, adotou-se a utilização de água MilliQ para a confecção de todas as soluções. Como o volume de água utilizado nas diferentes soluções para corar um gel de seqüenciamento é muito grande, optou-se pela utilização (até que fossem obtidas bandas expressas diferencialmente) de mini-géis de poliacrilamida 6% não desnaturante. A utilização da água MilliQ, de reagentes novos e algumas modificações no processo de lavagem e no tempo de fixação do gel, garantiram um aumento na definição das bandas e uma diminuição da coloração de fundo (*background*) (Figuras 4B e 5).

Após ter-se conseguido um protocolo satisfatório para a coloração com  $\text{AgNO}_3$ , tiveram prosseguimento os testes das modificações nas condições das ddPCRs propostas por Matz & Lukyanov (1998).

Em relação ao número de ciclos de amplificação, adotou-se o padrão de 25 ciclos, para analisar a possível influência do efeito  $C_0t$  (*C<sub>0</sub>t effect*) sobre os resultados até então obtidos. Nos ciclos finais da PCR, a velocidade do processo de reassociação dos produtos muito abundantes e a velocidade de anelamento dos iniciadores torna-se comparável, retardando a amplificação do fragmento até um platô ser alcançado. Ao mesmo tempo, os produtos pouco abundantes continuam sendo eficientemente amplificados. Desta forma, se forem utilizados muitos ciclos de amplificação, as diferenças na abundância dos produtos tornam-se significativamente menores, com o efeito  $C_0t$  funcionando como um freio apenas para os produtos derivados das espécies de mRNA super abundantes (Matz & Lukianov, 1998).

Como nas primeiras ddPCR efetuadas, foram utilizados mais de 40 ciclos de amplificação, talvez as diferenças na expressão dos genes dos animais que

foram expostos aos dois tratamentos, tenham sido mascaradas, pois o efeito  $C_0t$  prejudica a visualização destas diferenças nas bandas obtidas.

Outras modificações nas condições da ddPCR, que começariam a ser testadas, eram pequenas alterações nas temperaturas de anelamento para cada iniciador utilizado, através de programas do termociclador que permitem a construção de gradientes de temperatura, na tentativa de se otimizar as condições utilizadas para a obtenção de bandas representativas e utilização de novas combinações de iniciadores, além da confirmação em PAGE 6% dos padrões de bandas obtidos pelos iniciadores T7TER (figuras 6), RPET22 (figura 6), OMP 20 e FPET 22 (figura 7).

Sendo assim, não foi possível identificar um padrão diferencial de bandas, aplicando-se a técnica de ddPCR com o conjunto de iniciadores testados entre os animais mantidos na água do mar e os que foram expostos a 0,1% de óleo diesel, pelos diferentes períodos de tempo testados. No entanto, estes resultados iniciais mostram que a técnica necessita ser bem padronizada antes de ser aplicada experimentalmente.

Apesar da ddPCR ser considerada “arcaica” em comparação com as mais recentes tecnologias de análise da expressão diferencial de genes, ainda é o método mais extensivamente utilizado. Uma das principais razões, é que a técnica pode ser executada em qualquer laboratório equipado com os reagentes e equipamentos padrões de biologia molecular. Além disso, necessita de relativamente pouco apoio na área de bioinformática, tendo sido utilizada com sucesso, por exemplo, em análises de expressão gênica em estudos embriológicos, desenvolvimento ontogenético e patologias clínicas, principalmente aquelas relacionadas ao surgimento de neoplasmas, além da

avaliação da resposta dos organismos a xenobióticos (Rhodes & Van Beneden, 1996; Shen & Green, 1998; Mahadeva *et al.*, 1998; Van Beneden, Rhodes & Gardner, 1998; Green *et al.*, 2001).

#### 4. Referências Bibliográficas

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.C; Moore, D.D; Seidman, J.G.; Smith, J.A.

& Struhl, K. Eds. - **Short Protocols in Molecular Biology**. 3<sup>rd</sup> ed. John

Wiley & Sons Inc., USA, 1995.

CNIO/Comissão Nacional Independente sobre os Oceanos – **II Workshop**

**Regional Sul sobre o Mar: “Repensando o mar para o século XXI.”**

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil, p. 2-32, 1998.

Debouck, C. – **Differential display or differential dismay?** *Current Opinion in*

*Biotechnology*, **6**: 597-599, 1995.

EHC 171. – **Environmental Health Criteria for diesel fuel and exhaust emission.** *International Programme of Chemical Safety, United Nation Environment Programme, International Labour Organisation, World Health Organization.* Geneva Swiss, 1996.

Disponível em [www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc171.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc171.htm)

Acesso em: 26/02/2003.

Green, C.D.; Simons, J.F.; Taillon, B.E. & Lewin, D.A. – **Open systems:**

**panoramic views of gene expression.** *Journal of Immunological*

*Methods*, **250**: 67-79, 2001.

Grimm, E.D.; Terenzi, M.F.; Goldman, G.H.; Bainy, A.C.D. & Terenzi, H.

**Identification of homologs of the mammalian P-glycoprotein in the**

**mussel, *Perna perna*.** *Marine Environmental Research* **50**: 333, 2000.

Head, I.M. & Swannell, R.P.J. - **Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats.** *Current Opinion in Biotech.*, **10**: 234-239, 1999.

Hugget, R.J.; Kimerle, K.A.; Mehrle Jr., P.M. & Bergman, H.L. Eds. - ***Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of anthropogenic stress***, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, **347**, 1992.

Inglis, G.J. & Kross, J.E. - **Evidence for systemic changes in the benthic fauna of tropical estuaries as a result of urbanization.** *Mar. Pollut. Bull.*, **41**: 367-376, 2000.

Jenny, M.J.; Ringwood, A.H.; Lacy, E.R.; Lewitus, A.J.; Kempton, J.W.; Gross, P.S.; Warr, G.W. & Chapman, R.W. – **Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from american oyster, *Crassostrea virginica*.** *Mar. Biotechnol.*, **4**: 81-93, 2002.

Jurecic, R. & Belmont, J.W. – **Long-distance dd-PCR and cDNA microarrays.** *Current Opinion in Microbiology*, **3**: 316-321, 2000.

Liang, P. & Pardee, A.B. – **Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.** *Science*, **257**: 967-971, 1992.

Luoma, S.N. – **The developing framework of marine ecotoxicology: Pollutants as a variable in marine ecosystems?** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **200**: 29-55, 1996.

Mahadeva, H.; Starkey, M.P.; Sheikh, F.N.; Mundy, C.R. & Samani, N.J. – **A simple and efficient method for the isolation of differentially expressed genes.** *J. Mol. Biol.*, **284**: 1391-1398, 1998.

Matz, M.V. & Lukyanov, S.A. – **Different strategies of differential display: areas of application.** *Nucleic Acids Research*, **26** (n° 24): 5537-5543, 1998.

Ranamukhaarachchi, D.G.; Rajeevan, M.S.; Vernon, S.D. & Unger, E.R. – **Modifying differential display polymerase chain reaction to detect relative changes in gene expression profiles.** *Analytical Biochemistry*, **306**: 343-346, 2002.

Rhodes, L.D. & Van Beneden, R.J. – **Gene expression analysis in aquatic animals using differential display polymerase chain reaction.** *In: Ostrander, G.K. – Techniques in aquatic toxicology.* Lewis Publishers, CRC Press, Florida, U.S.A., 161-183, 1996.

Rocha, O. - **A poluição química e a biodiversidade.** *VI Encontro de Ecotoxicologia e III reunião da SETAC Latino-americana.* São Carlos-SP, Brasil. **25**, 2000.

- Shen, W. & Green, M.R. – **Analysis of selective gene activation in yeast by differential display**. *METHODS: A companion to methods in Enzymology*, **16**:415-422, 1998.
- Sultan, A.; Abelson, A.; Bresler, V.; Fishelson, L. & Mokady, O. – **Biomonitoring marine environmental quality at the level of gene-expression- testing the feasibility of a new approach**. *Wat. Sci. Tech.*, **42** (n° 1): 269-274, 2000.
- Van Beneden, R.J.; Rhodes, L.D. & Gardner, G.R. – **Studies of the molecular basis of gonadal tumors in the marine bivalve, *Mya arenaria***. *Mar. Environ. Res.*, **46**: 209-213, 1998.
- Westermeier, R - ***Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations***. 2<sup>nd</sup> ed. VCH. Weinheim, Germany, 180-181, 1997.

### **Discussão Final**

A partir do conjunto de dados obtidos com a aplicação das técnicas aqui adotadas, foi possível avaliar algumas das respostas bioquímicas e moleculares do mexilhão *Perna perna* expostos ao óleo diesel.

A avaliação da exposição in situ de mexilhões *P. perna* a contaminantes, através da técnica de acúmulo de Rodamina, possibilitou a identificação de que o esgoto doméstico na Baía Norte (BN) promove um aumento na atividade da Pgp nas brânquias de *P. perna*, depois de 14 dias de permanência no local. Além disso foi possível correlacionar a aparente saturação do transporte da

Pgp, observada nos animais mantidos na Praia do Sambaqui (SAM), com a elevada concentração de matéria orgânica na água, evidenciada pelo aumento na turbidez em  $T_0$  e  $T_1$  (Capítulo I).

Através destes ensaios foi possível também, observar uma variação interpopulacional no nível de indução do mecanismo MXR. Os animais provenientes da Praia do Sambaqui (SM/SAM) e da Prainha da Barra da Lagoa (PB) apresentaram um menor acúmulo de ROD, na ausência de competição (grupos controles) comparando-se com os mexilhões da Joaquina (JQ) e do Moçambique (MO) (Capítulo II). Para que o nível de indução do MXR possa ser utilizado como biomarcador de susceptibilidade a contaminação, em indivíduos ou populações, é importante que haja um conhecimento prévio de variações na expressão do MXR interindividuais e interpopulacionais existentes naturalmente (Smital & Kurelec 1998, Kurelec et al. 2000).

Esta maior indução pode indicar a presença, neste locais, de quimiossensibilizadores na água. Esta observação parece ser corroborada pela maior frequência em que foi observada a saturação da Pgp nos mexilhões provenientes de PB (84%). A saturação do MXR não é, necessariamente, desencadeada pela presença de xenobióticos na água e pode refletir variações temporais nas condições ambientais, tais como turbidez da água, concentração de clorofila e concentração de compostos tóxicos naturais. Entretanto, os animais com o transporte bloqueado perdem a capacidade de lidar com compostos químicos tóxicos, presentes tanto na sua dieta habitual (algas, dinoflagelados) quanto na água, se esta estiver contaminada por alguma classe de poluente (Epel, 1998; Kurelec et al., 1998; Bard, 2000; Keppler & Ringwood, 2001).

Conforme observado nos mexilhões com a capacidade de transporte saturada, a presença do verapamil na água pode ser estressante, relacionando-se, talvez, ao efeito que este composto apresenta sobre a osmorregulação nesta espécie (Stucchi-Zucchi & Salomão, 1998; Ferreira & Salomão, 2000). Em função deste efeito apresentado pelo VER, sugere-se que, nos ensaios de acúmulo/efluxo de ROD sejam testadas, pelo menos, duas substâncias que funcionem como substrato da Pgp. No nosso estudo, a outra substância testada

foi o óleo diesel, o qual inibiu o transporte de ROD em ensaios de exposição simultânea. Observou-se que o óleo diesel dificulta o efluxo de ROD do meio intracelular, mas não interfere na sua difusão, sendo observado, ainda, um efeito aditivo na inibição do efluxo de ROD, no caso em que os mexilhões foram tratados, simultaneamente, com VER e óleo diesel (Capítulo II).

De maneira geral, os dados obtidos com os ensaios de transporte de ROD, indicam que a aparente tolerância que essa espécie de molusco apresenta em relação a presença de xenobióticos na água pode estar relacionada à indução do mecanismo MXR.

Segundo os resultados obtidos, através da aplicação da técnica de western blotting, a concentração de Pgp nas brânquias de *Perna perna* não varia em resposta a exposição ao óleo diesel (Capítulo II), nem em função da permanência em um local contaminado com esgoto doméstico (Capítulo I). Esta ausência de resposta pode indicar que *P. perna* é resistente a exposição a estes contaminantes ou que a técnica, conforme aqui aplicada, não se mostrou capaz de detectar as alterações nos níveis de Pgp.

A aplicação da ddPCR, para obtenção do padrão de genes diferencialmente transcritos nos animais expostos ao óleo, não produziu resultados satisfatórios (Capítulo IV). A padronização da técnica para aplicação em *P. perna* apresentou um avanço significativo. Os problemas enfrentados na presente pesquisa, também relatados na literatura consultada, relacionaram-se com a escolha de iniciadores inadequados, dificuldades na otimização das condições da ddPCR, técnicas inadequadas para detecção dos produtos obtidos e a obtenção de resultados falso positivos (Debouck, 1995; Matz & Lukyanov, 1998; Green et al., 2001).

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível levantar várias questões referentes a qualidade do ambiente marinho na Ilha de Santa Catarina que deverão ser esclarecidas em estudos posteriores. Os resultados destas pesquisas também indicaram que *Perna perna* é um bom sentinela ambiental, no entanto, deve-se ressaltar que esta espécie apresenta uma boa resistência a contaminação.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMBUDKAR, S. V.; DEY, S.; HRYCYNA, C. A.; RAMACHANDRA, M; PASTAN, I. & GOTTESMAN, M. M. – **Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** *Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 361-398, 1999.
- ASHIDA, H., OONISHI, T. & UYESAKA, N. – **Kinetic analysis of mechanism of action of the multidrug transporter.** *J. Theor. Biol.*, 195: 219-222, 1998.
- BAINY, A. C. D.; ALMEIDA, E. A.; MÜLLER, I. C; VENTURA, E. C. & MEDEIROS, I. D. – **Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil.** *Mar. Environ. Res.*, 50: 411-416, 2000.
- BARNES, R.D. - **Zoologia dos Vertebrados.** Ed. Roca, São Paulo, Brasil, 1984.
- BARD, S. M. – **Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms.** *Aquat. Toxicol.*, 48: 357-389, 2000.
- BARD, S. M. & STEGEMAN, J. J. – **Inhibition of rhodamina B transport in liver, brain and ovary by cyclosporin A: development of na in vivo model for analysis of P-glycoprotein function.** *Abstracts/Mar. Environ. Res*, 54: 461-463, 2002.
- BARRACO, M. A., MEDEIROS, I. D. & MOREIRA, F. M. – **Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*.** *Fish and Shellfish Immunol.*, 9: 387-404, 1999.
- BOLHIUS, H., VAN VEEN, H. W., POOLMAN, B., DRIESSEN, A. J. M. & KONINGS, W. N. – **Mechanism of multidrug transporter.** *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 55-84, 1997.

- BORST, P.; SCHINKEL, A.H.; SMIT, J.J.M.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMETER, L.; SMITH, A.J.; EIJDENS, E.W.H.M.; BAAS, F & ZAMAN, G.J.R. - **Classical and novel forms of multidrug resistance and physiological functions of P-glycoprotein in mammals.** *Pharmacol. Ther.*, **60**: 289-299, 1993.
- BORST, P. & OUDE ELFERINK, R. – **Mammalian ABC transporters in health and disease.** *Ann. Ver. Biochem.*, **71**: 537-592, 2002.
- BRADLEY, G.; GEORGES, E. & LING, V. - **Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in Chinese hamster.** *J. Cell Physiol.*, **145**: 398-408, 1990.
- BRASIL MMA/MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL. -**Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União (1:1.000.000), MCD/MMA,** Brasília, Distrito Federal, Brasil. 1996.
- BRITVIC, S. & KURELEC, B. – **The effects of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in waters spiked with premutagens.** *Aquat. Toxicol.*, **47**:107-116, 1999.
- BURTON, G.A. - **Realistic assessment of ecotoxicity using traditional and novel approaches.** *Aquat. Ecosystem Health and Management*, **2**: 1-8, 1999.
- CARVAJAL, R.J. - **Fluctuacion mensual de los larvas y crecimiento del mejillon *Perna perna* (L.) y las condiciones ambientales de la enseada de Guatapanase, Eno Sucre, Venezuela.** *Bol. Inst. Oceanogr. (Univ. Oriente)*, **8**:13, 1969.
- CHAPMAN, P.M. & WANG, F. - **Assessing sediment contamination in estuaries.** *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 3-22, 2001.

**CDUM/CONVENÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE O DIREITO DO MAR.** Versão em Língua Portuguesa, *DHN*, 1985.

**CNIO/COMISSÃO NACIONAL INDEPENDENTE SOBRE OS OCEANOS – II Workshop Regional Sul sobre o Mar: “Repensando o mar para o século XXI.”** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil, p. 2-32, 1998.

CORNWALL, R; TOOMEY, B.H.; BARD, S.; BACON, C.; JARMAN, W.M. & EPEL, D. - **Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates.** *Aquat. Toxicol.*, **31**: 277-296, 1995.

DEBOUCK, C. – **Differential display or differential dismay?** *Current Opinion in Biotechnology*, **6**: 597-599, 1995.

DEBRY, P.; NASH, E. A.; NECKLASON, D. W. & METHERALL, J. E. – **Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification.** *J. Biol. Chem.*, **272** (2): 1026-1031, 1997.

ENDICOTT, J.A. & LING, V. - **The biochemistry of P-glycoprotein- mediated multidrug resistance.** *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 137-171, 1989.

EHC 171. – **Environmental Health Criteria for diesel fuel and exhaust emission.** *International Programme of Chemical Safety, United Nation Environment Programme, International Labour Organisation, World Health Organization.* Geneva Swiss, 1996.

Disponível em: <http://>

Acesso em: 13/08/2001.

EPAGRI & UFSC. - **Manual de cultivo do mexilhão *Perna perna*.** Santa Catarina, Brasil, 1994.

- EPEL, D. – **Use of multidrug transporter as first lines of defense against toxins in aquatic organisms.** *Comp. Biochem. Physiol.*, **120** (A): 23-28, 1998.
- EPEL, D.; SADASIVAIAH, S. & CHAN, C. – **Are perfume ingredients a smoking environmental gun? Synthetic musk compounds can compromise the efficacy of the multi-drug/multi-xenobiotic transporter.** *Abstract/Mar. Environ. Res.*, **54**: 461-463, 2002.
- EUFEMIA, N.A. & EPEL, D. – **Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stress.** *Aquat. Toxicol.*, **49**: 89-100, 2000.
- GALGANI, F.; CORNWALL, R.; TOOMEY, B.H. & EPEL, D. - **Interaction of environmental xenobiotics with multixenobiotics defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California.** *Environ. Toxicol. Chem.*, **15** ; 325-331, 1995.
- GEORGES, E.; BRADLEY, G.; GARIEPY, J. & LING, V. - **Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 152-156, 1990.
- GOTTESMAN, M.M. & PASTAN, I. - **Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.** *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 385-427, 1993.
- GREEN, C.D.; SIMONS, J.F.; TAILLON, B.E. & LEWIN, D.A. – **Open systems: panoramic views of gene expression.** *Journal of Immunological Methods*, **250**: 67-79, 2001.
- GRIMM, E.D.; TEREZI, M.F.; GOLDMAN, G.H.; BAINY, A.C.D. & TEREZI, H. **Identification of homologs of the mammalian P-glycoprotein in the mussel, *Perna perna*.** *Marine Environmental Research* **50**: 333, 2000.

- GRIMM, E.D. - **Identificação do transportador ABC no mexilhão *Perna perna*. Trabalho de conclusão de curso**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2001.
- HAUMDOUM, A. M.; GRIFFIN, F. J. & CHERR, G. N. – **Tolerance to biodegraded oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter**. *Aquat. Toxicol.*, 61: 127-140, 2002.
- HEAD, I.M. & SWANNELL, R.P.J. - **Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats**. *Current Opinion in Biotech.*, 10: 234-239, 1999.
- HIGGINS, C.F. - **ABC transporters: from microorganisms to man**. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8: 67-113, 1992.
- HIGGINS, C. F. & GOTTESMAN, M. M. – **Is the multidrug transporter a flippase?** *TIBS*, 17: 18-21, 1992.
- HODGSON, E. & LEVI, P.E. Eds. - **Introduction to Biochemical Toxicology**. 2<sup>nd</sup> Ed. Appleton & Lange, Connecticut, U.S.A., 75-111, 1994.
- HOSE, J.E.; BROWN, E.D. - **Field applications of the piscine anaphase aberration test: lessons from the Exxon Valdez oil spill**. *Mutat. Res.*, 399: 167-178, 1998.
- HUGGET, R.J.; KIMERLE, K.A.; MEHRLE JR., P.M. & BERGMAN, H.L. Eds. - **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of anthropogenic stress**, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 347, 1992.
- INGLISH, G.J. & KROSS, J.E. - **Evidence for systemic changes in the benthic fauna of tropical estuaries as a result of urbanization**. *Mar. Pollut. Bull.*, 41: 367-376, 2000.

JENNY, M.J.; RINGWOOD, A.H.; LACY, E.R.; LEWITUS, A.J.; KEMPTON, J.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. & CHAPMAN, R.W. – **Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from american oyster, *Crassostrea virginica*.** *Mar. Biotechnol.*, 4: 81-93, 2002.

JOBLING, M. – *Environmental Biology of Fishes*. 1<sup>st</sup> Ed. Chapman & Hall, London, UK, 415-422, 1995.

JUNG, D.K.J.; KLAUS, T. & FENT, K. - **Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1.** *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 149-159, 2001.

JURECIC, R. & BELMONT, J.W. – **Long-distance dd-PCR and cDNA microarrays.** *Current Opinion in Microbiology*, 3: 316-321, 2000.

KELLER, A.E.; RUESSLER, D.S. & CHAFFEE, C.M. - **Testing the toxicity of sediments contaminated with diesel fuel using glochidia and juvenile mussels (*Bivalvia*, *Unionidae*).** *Aquat. Ecosystem Health and Management.*, 1: 37-47, 1998.

KURELEC, B. & PIVČEVIĆ, B.- **Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil sensitive binding of xenobiotics in a fresh water mussel *Anodonta cygnea*.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 934, 1989.

KURELEC, B. & PIVČEVIĆ, B.- **Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.** *Aquat. Toxicol.*, 19: 291, 1991.

- KURELEC, B. - **The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organism.** *Crit. Ver. Toxicol.*, **22**: 23-43, 1992a.
- KURELEC, B.; KRÈA, S.; PIVČEVIĆ, B.; UGARKOVIÆ, D.; BACHMANN, M.; IMSIECKE, G. & MÜLLER, W.E.G. – **Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug binding glycoprotein.** *Carcinogenesis*, **13**: 69, 1992b.
- KURELEC, B. - **The genotoxic disease syndrome.** *Mar. Environ. Res.*, **35**: 341-348, 1993.
- KURELEC, B.; KRÈA, S. & LUCIÆ, D. - **Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments.** *Comp. Biochem. Physiol.*, **113C**: 283-289, 1996.
- KURELEC, B. – **A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance.** *Environ. Health Perspec.*, **105**(4): 855-860, 1997.
- KURELEC, B.; BRITVIC, S.; PIVCEVIAC, B & SMITAL., T. – **Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity os risk assessment.** *Mar. Environ. Res*, **46**: 415-419, 1998.
- KURELEC, B.; SMITAL, T.; PIVČEVIĆ, B.; EUFEMIA, N. & EPEL, D. – **Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers.** *Ecotoxicology*, **9**: 307-327, 2000.
- LASIAK, T. - **The reproductive cycles of the intertidal bivalves *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) and *Perna perna* (Linnaeus, 1758) from Traskei Coast, Southern Africa.** *The Veliger*, **29**(2): 226-230, 1986.
- LEWIS, M.; SCOTT, G. & KLAINÉ, S.J. - **Marine and Estuarine Toxicology and Chemistry – Editorial.** *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 1-2, 2001.

- LIANG, P. & PARDEE, A.B. – **Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.** *Science*, **257**: 967-971, 1992.
- LONG, E.R.; HONG, C.B. & SEVERN, C.G. - **Relationships between acute sediment toxicity in laboratory tests and abundance and diversity of benthic infauna in marine sediments: a review.** *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 46-60, 2001.
- LÜDEKING, A. & KÖHLER, A. – **Identification of 6 mRNA sequences of genes related to multixenobiotic resistance (MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*.** *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **238**: 115-124, 2002.
- LUOMA, S. N. – **The developing framework of marine ecotoxicology: Pollutants as a variable in marine ecosystems?** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **200**: 29-55, 1996.
- MAGALHÃES, A.R.M. - **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 177p., 1985.
- MAHADEVA, H.; STARKEY, M.P.; SHEIKH, F.N.; MUNDY, C.R. & SAMANI, N.J. – **A simple and efficient method for the isolation of differentially expressed genes.** *J. Mol. Biol.*, **284**: 1391-1398, 1998.
- MARQUES, H. L. DE A.; PEREIRA, R. T. L. & CORREA, B. C. – **Seasonal variation in growth and yield of the brown mussel *Perna perna* (L.) cultured in Ubatuba, Brazil.** *Aquaculture*, **169**: 263-273, 1998.

MATZ, M.V. & LUKYANOV, S.A. – **Different strategies of differential display: areas of application.** *Nucleic Acids Research*, **26** (n° 24): 5537-5543, 1998.

MÉXICO IMP. Instituto Mexicano del Petroleo, 2000.

**Disponível em:** <http://www.imp.mx/petroleo>

Acesso em: 13/08/2001.

MINIER, C.; AKCHA, F. & GALGANI, F. – **P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater.** *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**: 1029-1036, 1993.

MINIER, C. & GALGANI, F. – **Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*.** *Mar. Environ. Res.*, **39**: 267-270, 1995.

MINIER, C. & MOORE, M.N. – **Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine.** *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **142**: 165-173, 1996.

MINIER, C.; BORGHI, V.; MOORE, M.N. & PORTE, C. - **Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*.** *Aquat. Toxicol.*, **50**: 167-176, 2000.

MOREIRA, F.M. - **Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos do mexilhão *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia).** Trabalho de conclusão de curso. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 4-8., 1995.

NASCIMENTO, I.A.; LEITE, M.B.N.; SANSONE, G.; PEREIRA, S.A. & SMITH, D.H. - **Stress protein accumulation as an indicator of impact by the petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil.** *Aquatic Ecosystem Health and Management.*, 1: 101-108, 1998.

- OBERDÖRSTER, E. & CHEEK, A.O. - **Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms.** *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 23-36, 2001.
- PIRES, K.; GARGIONI, R.; MARQUES, M.R.F.& BARRACO, M.A. - **Avaliação de parâmetros hematológicos em mexilhões Perna perna expostos ao óleo diesel.** *Res. XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.* Caxambu - MG, Brasil. **145**, 1998.
- PORTE, C.; BIOSCA, X.; SOLÉ, M. & ALBAIGÉS, J. - **The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress protein in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain).** *Environ. Pollut.*, **112**: 261-268, 2001.
- PRINCE, R.C. - **Bioremediation of marine oil spills.** *Tibtech.*, **15**: 158-159, 1997.
- ROCHA, O. - **A poluição química e a biodiversidade.** *VI Encontro de Ecotoxicologia e III reunião da SETAC Latino-americana.* São Carlos-SP, Brasil. **25**, 2000.
- RHODES, L.D. & VAN BENEDEN, R.J. - **Gene expression analysis in aquatic animals using differential display polymerase chain reaction.** *In: OSTRANDER, G.K. - Techniques in aquatic toxicology.* Lewis Publishers, CRC Press, Florida, U.S.A., 161-183, 1996.
- SALAZAR, M.H. & SALAZAR, S.M. - **In situ bioassay using transplanted mussels: I. Estimating chemical exposure and bioeffects with bioaccumulation and growth.** *Environ. Toxicol. Risk Assess.* ASTM STP, **1218**: 216-241, 1995.

- SALOMÃO, L.C.; MAGALHÃES, A.R.M. & LUNETTA, J.E. – **Sobrevivência de Perna perna (Mollusca, Bivalvia) a diferentes salinidades.** *Bol. Fisiol. Animal, Universidade de São Paulo*, 4:143-152, 1980.
- SANTAS, R.; KORDA, A.; TENENTE, A.; BUCHHOLZ, K. & SANTAS, P.H. - **Mesocosm assays of oil spill bioremediation with oleophilic fertilizers: Inipol, F1 or both?** *Mar. Pollut. Bull.*, **38**: 44-48, 1999.
- SCHIENGOLD, M.; SCHWANTES, L.; SCHWARTSMANN, G.; BOGO CHIES, J.A. & BEYER NARDI, N. - **Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny.** *Mechan. Ageing. Develop.*, **122**: 255-270, 2001.
- SCHIURINK, C.E. & GRIFFITHS, C.L. - **Marine mussels of Southern Africa - their distribution patterns, standing stocks, exploitation, and culture.** *Journal of Shellfish Research*, **9**(1): 75-85, 1990.
- SCHIURINK, C.E. & GRIFFITHS, C.L. - **A comparison of reproductive cycles and reproductive output in four southern african mussel species.** *Marine Ecology Progress Series*, **76**: 123-134, 1991.
- SHAROM, F. J.; LIU, R.; ROMSICKI, Y. & LU, P. – **Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies.** *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**: 327-345, 1999.
- SHEEHAN, D. & POWER, A. – **Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs.** *Comp. Biochem. Physiol.*, **123** (C): 193-199, 1999.
- SHEN, W. & GREEN, M.R. – **Analysis of selective gene activation in yeast by differential display.** *METHODS: A companion to methods in Enzymology*, **16**:415-422, 1998.

- SIKIC, B. I.; FISHER, G. A.; LUM, B. L.; HALSEY, J. ; BEKETIC-ORESKOVIC, L. & CHEN, G. – **Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein.** *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**:S13-S19, 1997.
- DA SILVA, P. M.; MAGALHÃES, A. R. M. & BARRACO, M. A. – **Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Buchephalidae) on *Perna perna* mussels from a cultured station in Ratonas Island, Brazil.** *J. Invert. Pathol.*, **79**: 154-162, 2002.
- SMITAL, T. & KURELEC, B. - **The chemosensitizer of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants.** *Mutat. Res.*, **399**: 43-53, 1998.
- SOLOMON, K.R. - **Ecotoxicology and environmental risk assessment.** Res. *VI Encontro de Ecotoxicologia e III reunião da SETAC Latino-americana.* São Carlos-SP, Brasil. **25**, 2000.
- STURN, A.; CRAVEDI, J.P. & SEGNER, H. - **Prochloraz and nonylphenol diethoxylate inhibit an *mdr1*-like activity *in vitro*, but do not alter hepatic levels of P-glycoprotein in trout exposed *in vivo*.** *Aquat. Toxicol.*, **53**: 215-228, 2001.
- SUMMERS, J.K. - **Ecological conditions of the estuaries of the Atlantic and Gulf Coasts of the United States.** *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 99-106, 2001.
- TOOMEY, B.H. & EPEL, D. – **Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins.** *Biol. Bull.*, **185**: 355-364, 1993.

- VAN BENEDEN, R.J.; RHODES, L.D. & GARDNER, G.R. – **Studies of the molecular basis of gonadal tumors in the marine bivalve, *Mya arenaria***. *Mar. Environ. Res.*, **46**: 209-213, 1998.
- VAN LEEUWEN, C.J. & HERMENS, J.L.M. – **Risk assessment of chemicals: an introduction**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Chapter 3. 1995.
- WALDMANN, P.; PIVČEVIĆ, B.; MULLER, W.E.G.; ZAHN, R.K. & KURELEC, B.- **Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea***. *Mutat. Res.*, **342**: 113-123, 1993.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. – **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Ltd. London. Chapters 4-5, 1996.
- WILLIAMS, D.E.; LECH, J.J.; BUHLER, D.R. - **Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P-450 and carcinogenesis**. *Mutat. Res.*, **399**: 179-192, 1998.
- WIRGIN, I. & WALDMAN, J.R. - **Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations**. *Mutat. Res.*, **399**: 193-219, 1998.
- WOOTTON, A.N.; HERRING, C.; SPRY, J.A.; WISEMAN, A.; LIVINGSTONE, D.R. & GOLDFARB, P.S. - **Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp.** *Mar. Environ. Res.*, **39**: 21-26, 1995.
- WURGLER, F.E.; KRAMERS, P.G.N. - **Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology)**. *Mutagenesis*, **7**: 321-327, 1992.

