Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Dayane Sereno Baêta Rodrigues

Poluentes marinhos como fatores de estresse em esponjas e mexilhões

Rio de Janeiro

2011

Dayane Sereno Baêta Rodrigues

Poluentes marinhos como fatores de estresse em esponjas e mexilhões

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Gisele Lôbo-Hajdu

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Carla Zilberberg

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/A

R696 Rodrigues, Dayane Sereno Baêta.
Poluentes marinhos como fatores de estresse em esponjas e mexilhões / Dayane Sereno Baêta Rodrigues. 2011.
89 f.
Orientadora: Gisele Lôbo-Hajdu
Coorientadora: Carla Zilberberg.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.
1. Esponja – Contaminação – Teses. 2. Mexilhão – Contaminação – Teses. 2. Poluição marinha – Teses. I. Lôbo-Hajdu, Gisele. II. Zilberberg, Carla. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 592+639.4

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

_____ _____

Dayane Sereno Baêta Rodrigues Data

Dayane Sereno Baêta Rodrigues

Poluentes marinhos como fatores de estresse em esponjas e mexilhões

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em

Banca Examinadora:

_____
Dr.ª Daniela Batista Corneli da Silva
Departamento de Química da PUC-Rio

_____
Prof. Dr. José Lailson Brito Junior (presidente)
Faculdade de Oceanografia da UERJ

_____
Prof. Dr. Márcio Reis Custódio
Departamento de Fisiologia Geral da USP

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

A todos que de maneira direta ou indireta auxiliaram na execução deste trabalho

AGRADECIMENTOS

A Gisele Lôbo Hajdu, orientadora, e Carla Zilberberg, co-orientadora, pela paciência, incentivo e carinho.

À professora Dra. Sonia Barbosa, Departamento de Zoologia, pela cuidadosa revisão do conteúdo e da forma desta dissertação. Professora, algumas sugestões não puderam ser incorporadas devido à padronização exigida pela Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD) da UERJ. Por exemplo, a abreviação da expressão em latim “et alii” não pode ser colocada em itálico.

Ao professor Dr. Marcos Bastos, Faculdade de Oceanografia da UERJ e Diretor do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável (CEADS), pelas amostras de mexilhão.

Aos professores Márcio Custódio, Universidade de São Paulo, Werner E.G. Müller e Hans-Christopher Scröder, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

As agências financiadoras do projeto: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (Cnpq) e Bundesministerium für Buildung und Forschung (BMBF).

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela licença permanente, SISBIO nº 11175-1, para coleta de material zoológico.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Marinha (LGMar), especialmente Gabriela Amaral, José Milton Cardoso e Valéria Aguiar pela grande ajuda nos ensaios. Ao Thiago de Paula e ao José Henrique Mello pelo auxílio com as análises estatísticas e, ao último, pela revisão e sugestões no texto final.

A todos que auxiliaram as coletas e experimentos.

Aos amigos pelo carinho, auxílio e apoio, especialmente nos momentos difíceis.

A meus pais, Elaine e Roberto, a minha imã Aryane, aos tios Benito e Rosemary e a toda família por sempre me apoiar de várias formas, pela força, paciência e incentivo.

RESUMO

RODRIGUES, Davane Sereno Baêta. *Poluentes marinhos como fatores de estresse em esponjas e mexilhões*. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A biota marinha está exposta a uma elevada quantidade de substâncias tóxicas que podem causar graves problemas ao ambiente. As esponjas (Porifera) e os mexilhões (Mollusca) por serem sésseis e filtradores são utilizados como bioindicadores de poluição. A experimentação com aquários permite a realização de ensaios controlados, acompanhamento da resposta a diversos poluentes, concentrações e tempo de exposição. Os objetivos deste estudo foram: I). avaliar a imunocompetência através da expressão de proteínas do sistema imune Fator Inflamatório de Enxerto' AIF-1 e pP38 por teste de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) em esponjas expostas a poluentes, II) acompanhar a expressão das proteínas AIF-1 e pP38 nas cinco espécies de esponjas marinhas: *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862, *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy 2001, *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) e *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910) após exposição a lipopolisacarídeo (LPS) de *E. Coli* III) avaliar a expressão das proteínas AIF-1 e pP38 nas espécies *C.* aff. *nucula* e *P. janeirensis* após exposição a dodecil sulfato de sódio (SDS) IV) avaliar a mortalidade de mexilhões quando expostos ao dispersante Triton X-100™ e esgoto doméstico *in natura*. Os resultados indicam que as esponjas *A. fulva, C. aff. nucula, D. robusta* e *P. janeirensis* expostas a 20 µg/mL de LPS por 30 minutos, uma, três, 24 e 48 horas apresentaram aumento de expressão da proteína AIF-1 em relação ao controle, com diferentes tempos de resposta para cada espécie. A esponja *H. heliophila* exposta a 30 µg/mL de LPS apresentou diferença significativa na expressão de AIF-1 em relação ao controle na exposição por 30 min, uma, quatro, 24 e 48 horas. Contudo, não houve diferença significativa na expressão de outra proteína, a quinase pP38, nesses ensaios. As esponjas *C.* aff. *nucula* e *P. janeirensis* foram expostas a 0,25 mg/L de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 24 e 48 horas. *C.* aff. *nucula* apresentou aumento da expressão de AIF-1 quando comparada ao controle em 24 e 48 horas, mas para *P. janeirensis* não houve diferença significativa. Os mexilhões *Perna perna* foram expostos a poluentes de duas maneiras a detergente Triton X-100™ 0,10 g/L por três, seis, 12 e 18 horas que induziu diferença significativa na mortalidade em seis, 12 e 18 horas em comparação com o controle e a a esgoto doméstico *in natura* diluído na proporção de 1:50 não houve mortalidade no tratamento ou no controle. A variação da expressão da proteína AIF-1 observada nas cinco espécies de esponjas marinhas confirma a utilização dessa proteína como eficiente biomarcador de estresse. Os mexilhões foram bons bioindicadores da poluição por detergente.

Palavras-chave: Porifera. *Perna perna.* Biomarcadores. Poluição.

ABSTRACT

Marine biota is constantly exposed to several toxic substances which may cause severe environmental problems. Sponges (Porifera) and mussels (Mollusca) are often used as pollution bioindicators mainly due to their sessile and filter feeding habits. Laboratory experiments using aquaria enable the performance of controlled assays, following the various responses of animals to different concentrations and types of pollutants, besides of exposure time. The aims of this study were: I) evaluate the immunocompetence using proteins of the immune system Allograph Inflammatory Factor (AIF-1) and Pp38 by ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* in sponges exposure to pollutants II) evaluate the expression of AIF-1 and pP38 at the five species of marine sponges *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862, *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy 2001, *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) e *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910) after exposure to *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) III) evaluate the expression of AIF-1 and pP38 in *C.* aff. *nucula* and *P. janeirensis* after exposure to sodium dodecyl sulfate (SDS) IV) evaluate the mortality of mussel *Perna perna* after exposed to detergent Triton X-100™ and domestic sewage The results indicate that *A. fulva*, *C. aff. nucula*, *D. robusta* and *P.janeirensis* sponges exposed to 20 µg/mL of *E. coli* LPS during 30 minutes, one, three, 24 and 48 hours presented an increase in AIF-1 expression when compared to controls, at different response times for each species. The sponge *H. heliophila* exposed to 30 µg/mL of LPS presented a significant difference in the expression of AIF-1 compared to control, in short (30 min, one four hours) and long (24 and 48 hours) time exposure assays, but there were no significant difference in the expression of pP38 protein in any of the assays. Sponges *C.* aff. *nucula* and *P. janeirensis* were exposed to 0.25 mg/L of sodium dodecyl sulfate (SDS) for 24 and 48 hours. *C* aff. *nucula* showed increased expression of AIF-1 when compared to the control at 24 and 48 hours. For *P. janeirensis* there were no significant difference between treatments and controls. *Perna perna* mussels were exposed to pollutants in two assays. The animals were exposed to the detergent Triton X-100™ 0.10 g/L for three, six, 12 and 18 hours. There were significant differences in mortality in six, 12 and 18 hours. The mussels were also exposed to domestic sewage diluted in 1:50 proportion. This assay did not induce mortality in the treatment and control. The variation in the expression of AIF-1 protein observed in five species of the marine sponges confirms the efficient use of this protein as a stress biomarker. It was demonstrated that mussels are good bioindicators of detergent pollution.

Keywords: Porifera, *Perna perna*, Biomarkers, Pollution.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão da proteína AIF-1 em *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento..... 60

Gráfico 2 - Expressão da proteína AIF-1 em *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. No tempo de exposição de 1 hora, somente um individuo foi amostrado..... 61

Gráfico 3 - Expressão da proteína AIF-1 em *Dysidea robusta*, Vilanova e Muricy, 2001 exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. No tempo de exposição de 3 horas, somente um individuo foi amostrado para LPS..... 62

Gráfico 4 - Expressão da proteína AIF-1 em *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento..... 62

Gráfico 5 - Expressão da proteína AIF-1 em *Hymeniacidon* heliophila (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em três tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. A barra horizontal indica em qual tempo de exposição a expressão de AIF-1 foi significativamente diferente entre controle e tratamento..... 63

Gráfico 6 - Expressão da proteína AIF-1 em *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em dois tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. A barra horizontal indica em qual tempo de exposição a expressão de AIF-1 foi significativamente diferente entre controle e tratamento..... 64

Gráfico 7 - Expressão da proteína P38 fosforilada (pP38) em *Hymeniacidon* heliophila (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em três tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento..... 65

Gráfico 8 - Expressão da proteína P38 fosforilada (pP38) em *Hymeniacidon* heliophila (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em 24 e 48 horas de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento..... 66

Gráfico 9 - Expressão da proteína AIF-1 em *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 exposta a 0,25 mg/L de SDS em 24 e 48 horas de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento..... 67

Gráfico 10 - Expressão da proteína AIF-1 em *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) exposta a 0,25 mg/L de SDS em 24 e 48 horas de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento..... 68

Gráfico 11 - Número de mexilhões mortos no ensaio de exposição ao Triton X-100™ em quatro tempos. O valor nas colunas é a porcentagem de mortalidade no ensaio. Os asteriscos destacam os resultados significativos; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. As barras de controle (3, 6, 12 e 18 horas) e Triton (3 horas) não são visualizadas porque nenhum animal morreu..... 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da seqüência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico (retirado de Trevisan, 2008)... 21

Figura 2 - *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), no Santuário Ecológico da Reserva Extrativista da Ilha do Cabo Frio, na Pedra Vermelha, Arraial do Cabo, R.J. O tamanho real aproximado é de 120 x 180 mm (Foto: Gisele Lôbo-Hajdu)..... 32

Figura 3 - *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 (Foto: Gisele Lôbo-Hajdu)..... 33

Figura 4 - *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001, no Parque Natural dos Corais, Praia da Tartaruga, Armação dos Búzios, R.J. O tamanho real aproximado é de 120 x 180 mm (Foto: Eduardo Hajdu)..... 35

Figura 5 - *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910), no costão, próximo ao Clube Costa Brava, Rio de Janeiro, R.J., a 3 metros de profundidade (Foto: Guilherme Muricy)..... 36

Figura 6 - *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973), na Prainha, em Arraial do Cabo, R.J. O tamanho real é de aproximadamente 60 x 90 mm (Foto: Gisele Lôbo-Hajdu)..... 37

Figura 7 - Mapa de localização das coletas para esponjas marinhas. Em destaque a linha da costa do estado do Rio de Janeiro..... 38

Figura 8 - Vista aérea Praia de João Fernandinho, Armação dos Búzios, R.J. (www.buzios-exporer.com.br)..... 39

Figura 9 - Vista aérea da Praia da Tartaruga, atualmente parte do Parque Natural dos Corais, Armação dos Búzios, R.J. (www.buzios-explorer.com)..... 39

Figura 10 - Foto do canto esquerdo da Praia Vermelha, Rio de Janeiro, R.J. (www.feriasbrasil.com.br)..... 40

Figura 11 - Aquário marinho de 200 litros (L) para manutenção e aclimatação das esponjas..... 41

Figura 12 - Esquema das etapas iniciais para realização ensaios de exposição aos poluentes com esponjas..... 42

Figura 13 - Esponjas em ensaios de imunocompetência. A-C e E: Esponjas em tubos de 50 mililitros com aeração, D: esponja sendo partida em pedaços para colocação nos tubos de ensaio..... 43
Figura 14 - Esquema de passos da exposição das esponjas ao lipopolissacarídeo e ao dodecil sulfato de sódio..... 44
Figura 15 - Esquema da exposição de *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862*, Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001 e *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) a lipopolissacarídeo (LPS) (C=Controle e T= Tratamento)..... 45
Figura 16 - Esquema da exposição curta de *Hymeniacidon heliophila* (Parker 1910) a lipopolissacarídeo (LPS) (C=Controle e T= Tratamento)..... 46
Figura 17 - Esquema da exposição longa de *Hymeniacidon heliophila* (Parker 1910) a lipopolissacarídeo (LPS) (C=Controle e T= Tratamento)..... 47
Figura 18 - Esquema da exposição de *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 e *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) a dodecil sulfato de sódio SDS (C=Controle e T= Tratamento)..... 48
Figura 19 - Esquema das etapas do método de Bradford (modificado de www.bioagency.com.br)..... 49
Figura 20 - Exemplo de curva BSA para quantificação por teste de Bradford..... 50
Figura 21 - Esquema do teste de ELISA (modificado de Amelie Châtel, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)..... 51
Figura 22 - Mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em um costão rochoso (www.blogspot.pescaemar.com.br)..... 53
Figura 23 - Mapa de localização das coletas de Mollusca..... 55
Figura 24 - Esquema da exposição de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) a Triton X-100™..... 57
Figura 25 - A: Esgoto doméstico *in natura* coletado na estação de tratamento de esgoto do CEADS (B)..... 58
Figura 26 - Esquema da exposição de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) esgoto doméstico *in natura*..... 59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIF-1	Fator Inflamatório de Enxerto, do inglês *Allograph Inflammatory Factor* - 1
A. fulva	*Aplysina fulva*
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*
C. aff. *nucula*	*Chondrilla* aff. *nucula*
CEADS	Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável
cm	Centímetro
DAP	do inglês *Diallyl Phthalate*
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
ELISA	do inglês *Enzyme linked immuno sorbent assay*
F	Probabilidade acumulada
g	grama
G. *cydonium*	*Geodia cydonium*
GL	Graus de liberdade
GST	do inglês, *Glutathione S-Transferase*
h	hora
H. heliophlila	*Hymeniacidon heliophlila*
HRP	do inglês *Horse Radish Peroxidase*
HSP	do inglês *Heat shock proteins*
Iba-1	do inglês *Ionized calcium binding adapter molecule-1*
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
Ig	Imunoglobulinas
ITOPF	do inglês The International Tanker Owners Pollution Federation
Kg	quilograma
K-S	Kolmogorov Smirnov
L	litro
LGMar	Laboratório de Genética Marinha
LPS	Lipopolissacarídeo

m	metro
MAPK	do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*
MAPKK	do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases* - Duas fosforilações
MAPKKK	do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases* - Três fosforilações
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	millimolar
MSCR	do inglês *Mixed Sponge Cell Reaction*
N	Número amostral
NF-?B	do inglês *Nuclear factor kappa-ligth-chain-enhancer of activated B cells*
nm	nanômetro
Nº	Número
NOD	like - Nucleotide binding Oligomerization Domain
P. perna	*Perna perna*
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*
PAMP	do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PBS	do inglês *Posfate Buffered Saline*
PBS-T	do inglês *Posfate Buffered Saline plus Tween-20*
PCBs	Bifenil policlorados do inglês *Polychlorinated biphenyl*
P.*janeirensis*	*Polymastia janeirensis*
PK	proteínas quinases de defesas, do inglês *Protein Kinases*
Poly P	Polifosfatos inorgânicos, do inglês *Inorganic polyphosphate*
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
ppm	partes por milhão
pP38	Proteina P38 fosforilada
PRR	do inglês *Pattern Recognition Receptors*
r.p.m	rotações por minuto
Ras	do inglês *Rat Sarcoma*
RIG-I	do inglês *Retinoid Inducible gene I*
RJ	Rio de Janeiro

RNA	Ácido ribonucleico
s	segundo
S. domuncula	*Suberites domuncula*
SAPK2	do inglês *Stress-Activated Protein Kinase* -2
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
T	Teste T de Student
T0	Tempo zero
TBS	do inglês *Tris Buffered Saline*
TBT	do inglês *Tributyltinestanho*
TBTC	do inglês *Tributyltin chlorine*
TBTO	do inglês *Tributyltin oxide*
TCF	do inglês *T Cell-specific transcription Factor*
TDTMA	do inglês *Tetradecyltrimethllammonium bromide*
TLR	do inglês *Toll-like receptor*
TMB	3,3,5,5-Tetrametilbenzidino
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
WHO	*World Health Organization*
µg	micrograma
µl	microlitro
ºC	Graus Celcius

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	18
1.1	**Monitoramento ambiental**.....	18
1.2	**Biomarcadores**.....	21
1.3	**Sistema Imune**.....	22
1.4	**Biomarcadores relacionados ao sistema imune**.....	23
1.5	**Características Gerais de Porifera**.....	24
1.6	**Sistema Imune em Esponjas**.....	26
1.7	**Esponjas como bioindicadoras**.....	27
1.8	**Características Gerais de Mollusca com foco na classe Bivalvia**.....	27
1.9	**Classe Bivalvia**.....	28
1.10	**Mexilhões como Bioindicadores**.....	29
1.11	**Foco da dissertação**.....	30
2	**OBJETIVOS**.....	31
2.1	**Objetivo Geral**.....	31
2.2	**Objetivos Específicos**.....	31
3	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	32
3.1	**Experimentos com Porifera**.....	32
3.1.1	Espécies Estudadas.....	32
3.1.1.1	*Aplysina fulva* (Pallas, 1766)	32
3.1.1.2	*Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862.....	33
3.1.1.3	*Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001.....	34
3.1.1.4	*Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910)	35
3.1.1.5	*Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973)	36
3.1.2	Coleta e Transporte de Porifera.....	37
3.1.3	Aquário de Manutenção e Aclimatação das Esponjas.....	41
3.1.4	Ensaio de Imunocompetência.....	42
3.1.5	Passos para a Realização da Exposição aos Poluentes.....	44
3.1.6	Experimentos de Exposição ao Poluente	45

3.1.6.1 Exposição ao LPS em quatro espécies de esponjas marinhas: *Aplysina fulva*, *Chondrilla* aff. *nucula*, *Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis*..... 45
3.1.6.2 Exposição ao Lipopolisacarídeo na espécie *Hymeniacidon heliophila*..... 46
3.1.6.2.1 Exposição curta..... 46
3.1.6.2.2 Exposição longa..... 46
3.1.6.3 Exposição das esponjas *Chondrilla* aff. *nucula* e *Polymastia janeirensis* a dodecil sulfato de sódio (SDS) 47
3.1.7 Extração de proteínas..... 48
3.1.8 Quantificação das amostras..... 48
3.1.9 Expressão de proteínas..... 50
3.1.10 Análises estatísticas..... 52
3.2 **Experimentos realizados com Mollusca**..... 53
3.2.1 Espécie estudada *Perna perna* (Linnaeus, 1758) 53
3.2.2 Coleta e transporte de Mollusca..... 54
3.2.3 Experimentos de Exposição ao Poluente..... 56
3.2.3.1 Ensaio de exposição dos mexilhões ao Triton X-100™ - avaliação de mortalidade..... 56
3.2.3.2 Ensaio de exposição dos mexilhões a esgoto doméstico *in natura* - avaliação de mortalidade..... 57
3.2.4 Análises estatísticas..... 58
4 **RESULTADOS**..... 60
4.1 **Resultados referentes a Porifera**..... 60
4.1.1 Porifera expostos à lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria..... 60
4.1.1.1 Espécie *Aplysina fulva* (Pallas, 1766) 60
4.1.1.2 Espécie *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862..... 61
4.1.1.3 Espécie *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001..... 61
4.1.1.4 Espécie *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) 62
4.1.1.5 Espécie *Hymeniacidon heliophila* (Parker,1910) 63
4.1.1.5.1 Avaliação da expressão de AIF em tempos curtos..... 63
4.1.1.5.2 Avaliação da expressão de AIF em tempos longos..... 64
4.1.1.5.3 Avaliação da expressão de pP38 em tempos curtos..... 65

4.1.1.5.4 Avaliação da expressão de pP38 em tempos longos..... 65
4.1.2 Porifera expostos ao dodecil sulfato de sódio (SDS)..... 66
4.1.2.1 Espécie *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862..... 66
4.1.2.2 Espécie *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973)..... 67
4.2 **Resultados referentes a Mollusca**..... 68
4.2.1 Ensaios de exposição dos mexilhões a poluentes..... 68
4.2.1.1 Exposição de *Perna perna* ao detergente não iônico, Triton X-100™..... 68
4.2.1.2 Exposição de *Perna perna* a esgoto doméstico *in natura*..... 69
5 **DISCUSSÃO**..... 70
5.1 **Ensaios de exposição das esponjas a poluentes**..... 70
5.1.1 Porifera expostos à Lipopolissacarídeo de bactéria: Espécies *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula, Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis*..... 70
5.1.2 Avaliação da expressão de AIF-1 e pP38 após a exposição ao LPS em *Hymeniacidon heliophila*..... 71
5.1.3 Avaliação da expressão de AIF-1 após a exposição ao dodecil sulfato de sódio (SDS) em *Chondrilla* aff. *nucula e Polymastia janeirensis*..... 72
5.2 **Ensaios de exposição dos mexilhões a poluentes**..... 73
5.2.1 Exposição de *Perna perna* ao Triton X-100™..... 73
5.2.2 Exposição de *Perna perna* ao esgoto doméstico *in natura*..... 74
6 **CONCLUSÕES**..... 76
6.1 **Porifera**..... 76
6.2 **Mollusca**..... 77
7 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... 78

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DA LITERATURA

A poluição aquática é um evento que ocorre desde o início da civilização humana (Shahidul Islam e Tanaka, 2004). Porém, com o crescimento da industrialização e da urbanização, os ecossistemas lacustres e marinhos passaram a sofrer grandes impactos (Fent, 2004). Águas contaminadas por numerosos compostos sintéticos, descarga de dejetos provenientes de efluentes industriais e domésticos, agrotóxicos oriundos da drenagem agrícola, derramamentos causados pela exploração do petróleo e uma ampla gama de agentes tóxicos, tais como metais pesados e compostos orgânicos diversos, produzidos pela atividade humana atingem os rios, lagos, nascentes e oceanos (Fent, 2004; Cajaraville et al., 2000).

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente. Estes poluentes são capazes de interagir com os organismos vivos causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios, podendo variar de simples alterações fisiológicas até a morte de populações inteiras (Arias et al., 2006). Muitos dos compostos poluidores podem sofrer biomagnificação nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, atingindo desta forma locais distantes de seu ponto inicial de descarga e em áreas onde não há atividade humana significativa (Sarkar et al., 2006). Devido a estes fatores o monitoramento ambiental é importante para o acompanhamento dos efeitos da poluição.

1.1 Monitoramento ambiental

As comunidades biológicas representam a integridade ecológica dos ecossistemas (p. ex., integridade física, química e biológica), agregando os efeitos dos diferentes agentes e fornecendo uma medida conjunta dos impactos (Barbour et al., 1999).

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 001, 23/01/86, Artigo 1º: *"Considera-se impacto ambiental qualquer alteração das*

propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam: i) a saúde, a segurança e o bem-estar da população; ii) as atividades sociais e econômicas; iii) a biota; iv) as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; V) a qualidade dos recursos ambientais".

Devido a grande extensão dos impactos antropogênicos, o monitoramento ambiental tem sido imprescindível para diferenciar as modificações antrópicas das variações naturais. Além disso, o monitoramento ambiental é importante para estabelecer uma base para futuras comparações, avaliar a recuperação de ambientes já impactados, além de prever e estimar a magnitude de um impacto (Santos, 2007).

O monitoramento ambiental pode ser feito através de variáveis físico-químicas e biológicas. O monitoramento de variáveis físicas e químicas é relevante na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, tais como a identificação imediata de modificações nas propriedades físico-químicas da água, a detecção precisa da variável modificada, além da determinação destas concentrações alteradas (Whitfield, 2001). Entretanto, este sistema apresenta algumas desvantagens, como, por exemplo, a descontinuidade temporal e espacial das amostragens, que é causada pela retirada amostral. Por questões metodológicas, o monitoramento dessas variáveis é geralmente pontual e descontínuo, fornecendo apenas uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação altamente dinâmica (Whitfield, 2001).

O monitoramento biológico é a utilização de um ser vivo, denominado bioindicador, como ferramenta para acompanhamento da resposta de ecossistemas aos impactos ambientais (Goulart e Callisto, 2003). Os bioindicadores são divididos em duas categorias principais: i) as associadas aos níveis superiores de organização como populações, comunidades e ecossistemas; e ii) as associadas ao nível individual, que tratam das alterações comportamentais, das más formações, das mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímicas e fisiológicas (Arias et al., 2006).

Os organismos usados como bioindicadores são espécies que possuem alguma reação morfológica, bioquímica ou fisiológica que refletem as mudanças ambientais ocorridas. Conseqüentemente, qualquer alteração ambiental deve resultar em mudanças no bioindicador que são reproduzíveis e quantificáveis (Arias

et al., 2006). Um exemplo são os invertebrados bênticos, freqüentemente utilizados como bioindicadores por causa da resposta rápida ao estresse antropogênico e natural (Pearson e Rosenberg, 1978; Dauvin, 1993; Dauer et al., 2000; Bustos-Baez e Frid, 2003 *apud* Dauvin et al., 2007). O poliqueta *Capitella capitata* (Fabricius, 1780), por exemplo, é um bioindicador, já que um aumento na abundância desses animais está diretamente relacionado com o aumento das concentrações de matéria orgânica (Amaral et al., 2010).

As espécies sentinelas são monitores biológicos que acumulam poluentes em seus tecidos, mas que não sofrem alterações adversas significativas (Beeby, 2001). O uso de sentinelas oferece uma solução em potencial para problemas de mensuração da biodisponibilidade de poluentes no ambiente em contaminações (Beeby, 2001). Conhecendo os hábitos alimentares e modo de vida das espécies sentinelas seu uso pode facilitar a quantificação do efeito de poluentes em outras espécies que foram expostas a mesma fonte poluidora (Beeby, 2001). Vertebrados, tais como cetáceos e pinípedes, são exemplos de organismos utilizados como espécies sentinelas ambientais (Ross, 2000; Reddy et al., 2001; Wells et al., 2004 *apud* Dornelles et al*.,* 2008).

Um problema do monitoramento biológico no Brasil é que a legislação, apresentada no CONAMA nº 357, de 2005, que cita pela primeira vez o monitoramento biológico não faz qualquer menção à padronização dos métodos a serem usados no monitoramento biológico (Buss et al*.,* 2008). Mesmo assim, atualmente, várias redes de monitoramento de ecossistemas sugerem uma combinação de diversas ferramentas para avaliar a saúde do ambiente marinho. Além disso, a utilização de uma ampla gama de espécies e de habitats, representando diferentes níveis tróficos, é essencial para se obter uma visão global da biodisponibilidade dos poluentes em ecossistemas costeiros (Perez et al., 2003). Desta forma, o monitoramento ambiental tem sido uma ferramenta indispensável para um eficiente gerenciamento ambiental, uma vez que uma rápida detecção de impactos pode ser o diferencial para assegurar a sobrevivência de espécies ameaçadas.

1.2 **Biomarcadores**

As respostas da biota aos poluentes são distribuídas no tempo; algumas ocorrendo imediatamente após o evento poluidor, e outras podendo levar de dias a meses para se manifestar (Gomes et al., 2000).

Avaliar o nível de risco de inúmeros poluentes e seus derivados ao meio ambiente por meio de estudos macroecológicos (e.g., populações ou comunidades) é demasiadamente complexo, uma vez que os efeitos observáveis tendem a se manifestar após longos períodos de exposição (Moore et al., 2004). Além disso, as observações identificadas são distúrbios ecológicos como perda de biodiversidade, destruição do hábitat, declínio populacional, que muitas das vezes podem ser conseqüências irreversíveis da contaminação (Moore et al., 2004).

Os efeitos dos contaminantes ocorrem mais rapidamente em níveis de organização individual. A especificidade das respostas e nossa compreensão sobre os efeitos dos contaminantes também são geralmente maiores nos níveis mais baixos de organização (Arias et al., 2006). Isto porque, ao se estudar níveis de organização de elevada complexidade biológica, a detectabilidade e a resposta são prejudicadas devido à grande interposição dos fatores externos. Além disso, agentes biológicos mais simples possuem uma rápida resposta à perturbação, com menor interferência e com capacidade de previsibilidade, ponto fundamental para estudos ecotoxicológicos (Moore et al., 2004; Trevisan, 2008; Figura 1).

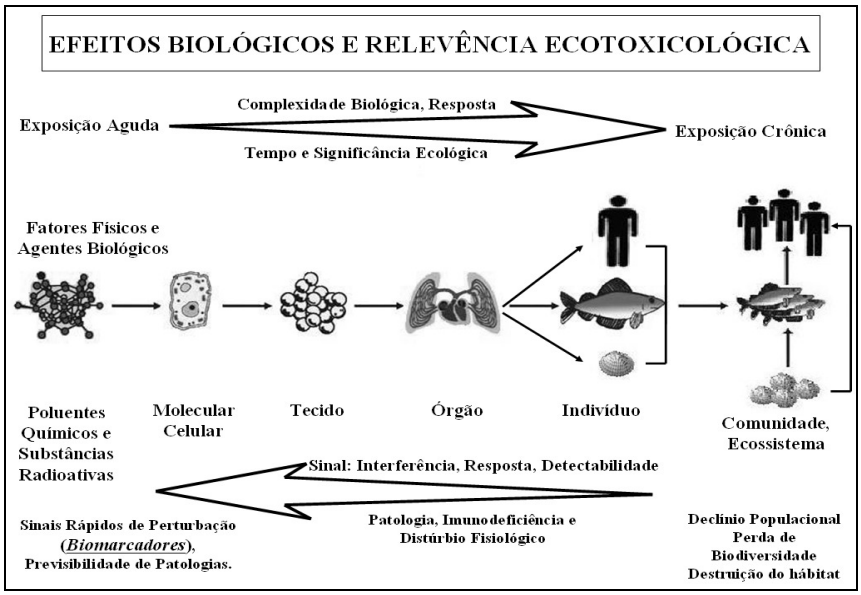

Figura 1 - Representação esquemática da seqüência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico (retirado de Trevisan, 2008).

Elucidar os mecanismos iniciais (em níveis moleculares e/ou celulares) de resposta rápida na presença de contaminantes pode garantir uma compreensão mais rápida sobre a situação do meio ambiente, a tempo de evitar danos maiores a níveis macroecológicos (WHO - *World Health Organization*, 2001). Neste contexto, chama-se de biomarcador qualquer substância, ou seus derivados, estrutura ou processo, que possa ser quantificado no organismo e que possa predizer ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença (WHO, 2001).

1.3 **Sistema Imune**

O sistema imune dos vertebrados apresenta duas vias principais: a imunidade inata e a imunidade adquirida. A imunidade inata é um mecanismo rápido e inespecífico que não requer exposição prévia e contato repetido com o antígeno. Já a imunidade adquirida é um processo mais elaborado, com elevado grau de especificidade e que requer exposição prévia para ativação, sendo observado um aumento na capacidade de resposta com a exposição repetida ao antígeno, sendo este processo denominado de memória imunológica (Parslow et al., 2004). Apesar de cada via do sistema imune possuir fatores e elementos celulares próprios, a máxima eficácia na defesa é atingida através da ação conjunta de ambos os mecanismos, o que ocorre após a produção de imunoglobulinas e mediadores celulares para o reconhecimento do não próprio (Parslow et al., 2004).

O sistema imune inato está presente em todos os metazoários e possui resposta imediata ao contato com microorganismos. Esta resposta é baseada em receptores expressos em células dos organismos expostas ao ambiente (Medzhitov e Janeway, 2000). A função destes receptores é de reconhecer estruturas muito conservadas dos microorganismos, chamadas padrões moleculares associados ao patógeno, ou PAMP (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Os receptores presentes nas células denominam-se receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *Pattern Recognition Receptors*). Alguns exemplos destes receptores são os *Toll-like* (TLR), *NOD-like* (do inglês *Nucleotide binding Oligomerization Domain*) e *RIG*-I (do inglês *Retinoid Inducible gene I*) (Medzhitov e Janeway, 2000).

1.4 **Biomarcadores relacionados ao sistema imune**

Proteínas relacionadas à resposta imune têm o potencial de serem eficientes biomarcadores de poluição. Existem numerosos exemplos de relações entre poluição e o aumento da susceptibilidade a doenças em espécies selvagens. Alguns exemplos incluem a imunossupressão em focas que se alimentaram de peixes em áreas contaminadas (Ross et al., 1996; Van Loveren et al., 2000), além de danos no DNA genômico de moluscos, ouriços (Taban et al., 2004) e cnidários (Vos, 1977).

A utilização de técnicas de biologia celular e molecular demonstrou que os invertebrados são providos de um sistema imune capaz de: eliminar microorganismos e poluentes através de fagocitose, produzir metabólitos secundários e induzir vias metabólicas fosforiladas; principalmente quando reagem a estresses ambientais antropogênicos (Vukmirović et al., 1994; Wiens et al., 2005). Os invertebrados marinhos exercem um papel chave na estrutura e sustentabilidade dos ecossistemas. Mesmo sendo importantes, muito pouco é conhecido sobre como a poluição ambiental pode afetar o sistema imunológico destes animais (Müller et al., 1999b).

Existe uma variedade de proteínas relacionadas à resposta imune descritas na literatura, embora, a maioria tenha sido descrita para vertebrados. Contudo, algumas proteínas homólogas foram identificadas em invertebrados, como é o caso da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*) (Böhm et al., 2000). Essas proteínas funcionam como sinalizadores e estão envolvidas no processo de proliferação e diferenciação celular, atuando como fatores de transcrição e ativando a expressão de genes do sistema imune (Böhm et al., 2000). Acredita-se que em invertebrados alguns estímulos externos, tais como estresse, poluentes, alta salinidade, variações na osmolaridade e temperaturas extremas desencadeiem sinais intracelulares sob vias sinalizadoras ativadas (Müller e Müller 1998; Müller et al., 2000).

A ativação dessas vias estimula a transdução de sinais por uma cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação de proteínas catalisadas pelas proteínas quinases e proteínas fosfatases, respectivamente. Para induzir a proliferação ou diferenciação celular, são necessários eventos sinalizadores de longa duração que consigam manter o sinal e transmiti-lo para o núcleo, onde irão alterar o padrão da transcrição gênica. As proteínas *Ras* (*rat sarcoma*) ativadas iniciam uma série de fosforilações de serinas e treoninas, que tem uma duração mais longa que outras

fosforilações (e.g. tirosinas quinases). Diversas serino-treonina quinases participam desta cascata de fosforilação. No entanto, o módulo básico da cascata é constituído de apenas três: MAPK, MAPKK e MAPKKK (onde cada evento de fosforilação adiciona um átomo de potássio). A quinase p38 de invertebrados apresenta grande homologia com proteínas quinases ativadas por estresse (SAPK2, *Stress-Activated Protein Kinase*-2) humanas, uma subfamília das MAPKs (Fukuda et al., 1997; Böhm et al., 2000).

O reconhecimento dos componentes próprios/não próprios pelo sistema imune em vertebrados está intimamente relacionado ao processo inflamatório, envolvendo citocinas e mecanismos da resposta inflamatória (Hayry et al*.,* 1984; Mason e Morris, 1986). Em invertebrados, além das proteínas quinases, a proteína 'Fator Inflamatório de Enxerto' (AIF-1, do inglês *Allograph Inflammatory Factor*) também apresenta uma alta similaridade com as correspondentes em mamíferos. Esta é uma molécula que está associada a respostas inflamatórias (Kruse et al., 1999; Müller et al*.,* 1999a), sendo expressada também em casos de rejeição a aloenxertos (Utans et al., 1995).

1.5 **Características Gerais de Porifera**

As esponjas marinhas (Filo Porifera) são em sua maioria organismos sésseis e filtradores. Elas constituem parte significativa da população bentônica tanto em número de espécies quanto em biomassa, sendo a Classe Demospongiae a mais abundante. Um número superior a 8.000 espécies já foi descrito, ocupando os mais diversos habitats do planeta, como regiões tropicais, temperadas e polares (Hooper e van Soest, 2002; Van Soest et al., 2011).

A morfologia das esponjas não é encontrada em nenhum outro táxon, sendo estruturada ao redor de um sistema de canais de água, cuja repartição espacial é fortemente influenciada tanto por fatores naturais quanto pela interação com outros organismos (Bergquist, 1978). As esponjas são compostas de diferentes linhagens celulares. O esqueleto é formado por espículas de carbonato de cálcio ou sílica e por fibras de espongina. A parede corporal externa, denominada pinacoderme, é formada por células epitelióides, chamadas pinacócitos. Cada poro é formado por um porócito, uma célula em forma de anel que se estende da superfície externa até a espongiocele (Rupert e Barnes, 1996; Van Soest et al., 2011). A cavidade dos

porócitos forma o ósculo. Abaixo da pinacoderme está o mesoílo, que é uma matriz gelatinosa e protéica que contém material esquelético e células amebóides. No lado interno, o mesoílo é revestido pela espongiocele, onde é observada uma camada de células flageladas, os coanócitos, responsáveis por movimentar a água através do corpo das esponjas para filtração (Rupert e Barnes, 1996; Van Soest et al., 2011).

Os poríferos apresentam capacidade de filtrar enormes quantidades de água (de 0,002 a 0,84 mL/s por cm^3 de tecido de esponja) através do seu sistema de canais aqüíferos (Vogel, 1977). Através do processo de filtração os poríferos obtêm alimento, retendo uma larga faixa de partículas orgânicas (de 0,1 a 50 µm), bactérias, fitoplâncton, etc. (Larsen e Riisgård, 1994). As partículas capturadas pelos coanócitos são transportadas para o mesoílo onde são digeridas por fagocitose pelos arqueócitos. Estes são células que apresentam totipotência, que é a capacidade de se diferenciar em outras células da esponja (Keller, 1995). Muitos microorganismos vivem associados ao mesoílo das esponjas (Wilkinson, 1978a, 1978b; Friedrich, 1999; Taylor et al., 2007).

Nas últimas duas décadas, as esponjas têm sido alvo de estudos em diferentes áreas da ciência. Esse interesse é causado não apenas pela grande variabilidade genética e fenotípica existente entre as espécies deste filo, mas, principalmente, devido à ampla associação das esponjas com microorganismos. Essa associação as torna um bom modelo para bioprospecção de novas drogas com aplicabilidade terapêutica. As esponjas são também um modelo clássico para o estudo da adesão célula-célula e célula-matriz celular (Müller et al., 2004).

Estudos recentes em genômica, transcriptômica e proteômica de esponjas têm contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos com a evolução molecular do sistema imune inato em Metazoa, do processo de apoptose, da interação dos poríferos com microorganismos e da produção de metabólitos secundários pelas esponjas e/ou seus simbiontes (Müller e Müller, 2003).

1.6 **Sistema Imune em Esponjas**

Acreditava-se que as esponjas, devido a sua fisiologia, apresentariam um sistema imune muito simples, ou seja, somente o sistema imune inato (Marchalonis e Schluter, 1994). Mas, contrariando esta idéia inicial, estudos com técnicas de biologia molecular identificaram nas esponjas proteínas que comprovam que elas apresentam reconhecimento próprio/não próprio, realizado por proteínas que também estão presentes em deusterostômios (Müller et al., 1999a).

Os primeiros elementos do sistema imune em esponjas foram identificados e analisados principalmente em *Suberites domuncula* Olivi, 1792 e *Geodia cydonium* Jameson, 1811 (Müller et al., 2000). As descobertas mais notáveis foram que: *(i)* em *G. cydonium* estão presentes receptores de superfície contendo domínios *Ig-like* polimórficos (imunoglobulinas) de tipos variáveis (Blumbach et al., 1999); *(ii)* existem moléculas transdutoras de sinal em *S. domuncula* e *G. cydonium* (Wimmer et al., 1999), que estão envolvidas nas vias de interferon, tais como 2-5A sintetase (Wiens et al., 1999), e, finalmente, *(iii)* citocinas e outros fatores de diferenciação são expressos em poríferos (Schröder et al., 2000).

Duas moléculas envolvidas nos processo de rejeição/fusão de implantes foram clonadas a partir de tecidos de esponjas: AIF-1 e um fator de transcrição *TCF-like* (do inglês *T Cell-specific transcription Factor*) e ambas mostram alta similaridade com as proteínas correspondentes em mamíferos *(*Kruse et al., 1999). Foi possível verificar que a expressão dos genes AIF-1 e TCF são aumentadas *in vivo* após transplante de tecidos, especialmente em aloenxertos. A descoberta de que Porifera tem moléculas homólogas às do sistema imune inato e adaptativo dos animais mais complexos (Müller et al., 2001) é especialmente interessante tendo em vista o fato de que as esponjas são, dentre os invertebrados marinhos, a fonte mais prolífica de compostos bioativos e o mais antigo grupo de metazoários (Müller, 2003).

Outros componentes já identificados no sistema imune inato de Porifera incluem uma grande variedade de receptores *Toll-Like*, fator de transcrição NF-κB (do inglês *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e proteínas quinases (PK, do inglês *Protein Kinase*) com relações com a ativação de caspases e indução de apoptose (Wiens et al., 2007). Contudo, sabe-se ainda muito pouco da associação de esponjas e microrganismos, dos mecanismos de defesas, do reconhecimento de bactérias (PAMP) e do papel da imunidade inata na produção de defesas químicas através de metabólitos secundários.

1.7 **Esponjas como bioindicadoras**

A repartição espacial das esponjas é fortemente influenciada tanto por fatores naturais como pela qualidade da água e, por isso, elas têm sido recomendadas como fortes candidatas a bioindicadores de poluição (Sara e Vacelet, 1973; Alcolado e Herrera, 1987; Muricy, 1989, 1991; Muricy et al., 1991; Muricy e Silva, 1999; Wulff, 2001) ou bioremediadores, removendo poluentes microscópicos (Reiswig, 1971; Milanese et al., 2003; Fu et al., 2007).

Os poríferos são expostos a vários tipos de doenças crônicas e contaminações podendo acumular metais pesados em concentrações elevadas, sem mostrar aparente mudança externa (Cebrian et al., 2003). No entanto, em dose subletal, as concentrações de metais podem exercer efeitos nocivos sobre as fases iniciais da vida das esponjas, como nas larvas, nos recrutas e nos juvenis, além de diminuir a resistência às infecções (Cebrian e Uriz, 2007). As esponjas podem acumular poluentes orgânicos persistentes (POPs) e os hidrocarbonetos poliaromáticos (PHAs) (Perez et al., 2000 *apud* Silva, 2010; Perez et al., 2003).

Alguns estudos utilizaram as proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *Heat shock proteins*) para avaliar o efeito de metais pesados em esponjas (Wiens et al*.,* 1998; Agell et al*.,* 2001; Schröder et al*.* 2006). Outro estudo utilizou a proteína metalotioneína para avaliar o efeito de metal pesado na esponja *Spongia officinalis* (Linnaeus, 1759) (Berthet et al*.,* 2005) e um trabalho mais recente mostrou que a proteína P38/MAPK é expressa na esponja *Suberites domuncula* quando exposta a camada de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Müller et al*.,* 2009).

1.8 **Características Gerais de Mollusca com foco na classe Bivalvia**

O Filo Mollusca é muito diverso, existem aproximadamente 50.000 espécies vivas de moluscos e cerca de 60.000 espécies de moluscos fósseis. É o maior grupo de animais, depois dos insetos (Magalhães, 1985). Estudos sobre esse filo já eram realizados na antigüidade por Aristóteles (Stix e Abbott, 1984 *apud* Henriques, 2004), mas foi no século XIX que realmente tomaram impulso, definindo-se, então, como Malacologia, o estudo das partes moles, da concha e da biologia do animal (Abbott, 1993). O filo possui sete classes: Aplaccophora, Placophora, Monoplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, Scaphododa e Cephalopoda (Brusca e Brusca, 2003).

Os moluscos são animais muito diferentes na aparência, mas possuem o plano básico corporal semelhante (Brusca e Brusca, 2003). São invertebrados, com um corpo não articulado, de simetria bilateral e que essencialmente está composto por quatro regiões: cabeça, pé, saco visceral e manto (Brusca e Brusca, 2003).

1.9 **Classe Bivalvia**

A classe Bivalvia, também chamada de Pelecypoda e Lamellibranchiata, possui cerca de 10.000 espécies. São encontrados na água doce e no ambiente marinho em todas as profundidades (Brusca e Brusca, 2003). A classe contém três grupos principais, distintos pela natureza de suas brânquias: Protobrânquios, Lamelibrânquios e Eulamelibrânquios (Brusca e Brusca, 2003).

Os bivalves são comprimidos lateralmente e possuem uma concha composta de duas valvas, encaixadas em dobradiças, que envolvem o corpo. O pé é lateralmente comprimido como o restante do corpo (Rupert e Barnes, 1996). A cabeça é rudimentar, sem olhos nem rádula, os estatocistos podem ocorrer em qualquer outra parte do corpo (Brusca e Brusca, 2003). A cavidade do manto é a mais espaçosa dos moluscos e as brânquias são geralmente muito grandes, tendo assumido na maioria das espécies uma função de coleta de alimento, além de realizar trocas gasosas (Rupert e Barnes, 1996). A maioria dos bivalves não apresenta pigmento respiratório e a ausência é correlacionada aos hábitos relativamente lentos e a grande superfície branquial (Rupert e Barnes, 1996). A excreção é realizada por um par de nefrídeos (Rupert e Barnes, 1996). A maioria das espécies é dióica, a fertilização geralmente é externa e o desenvolvimento planctônico, com um trocóforo e um velígero nas espécies marinhas (Rupert e Barnes, 1996).

1.10 **Mexilhões como Bioindicadores**

Os mexilhões (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) são organismos filtradores e sua capacidade de bioacumulação de metais pesados, entre outras substâncias, é bem conhecida e descrita na literatura (Ravera e Riccardi, 1997). Além disso, por serem bentônicos e resistentes a variações abióticas, como temperatura e salinidade, têm sido muito usados como bioindicadores de poluição e de transferência da mesma ao longo da cadeia trófica em uma dada localidade (Fischer, 1986). Vários programas de biomonitoramento mundiais utilizam bivalves para monitorar áreas impactadas e também para avaliar ações de melhorias ambientais, como é o caso do Programa *Mussel Watch* (O'Connor, 1998; Cantillo, 1998; Lauenstein e Daskalakis, 1998). Os bivalves utilizados nestes programas são normalmente cosmopolitas e postula-se que esta característica minimize os problemas inerentes às comparações de dados de espécies muito diferentes, com diferentes histórias de vida e de relacionamento com seus habitat (Farrington et al*.,* 1983). Os mexilhões apresentam atividade muito baixa ou indetectável dos sistemas enzimáticos que metabolizam xenobióticos, em comparação com peixes e crustáceos, concentrando os poluentes químicos e possibilitando uma avaliação mais acurada da magnitude da contaminação do ambiente (Farrington et al*.,* 1983).

Existe uma série de estudos de biomonitoramento ambiental utilizando compostos biomarcadores em mexilhões. Por exemplo, a proteína metalotioneína foi utilizada como marcadora do efeito de metais pesados (Viarengo et al., 1999). Já a proteína P38/MAPK foi utilizada para acompanhar a avaliação de fatores estressantes, como a variação de salinidade e o estresse oxidativo (Gaitanaki et al., 2004). Châtel e colaboradores (2010) acompanharam a expressão da proteína P38/MAPK após a exposição à tributiltina (TBT, do inglês *Tributyltin*), água oxigenada e fração solúvel do diesel. Todos os trabalhos citados utilizam *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) como modelo. O mexilhão *M. galloprovincialis* também já foi usado como modelo para acompanhamento da qualidade da água na Baía de Nice e Cannes, na França, pela atividade da transferase-S da glutationa (GST, do inglês *Glutathione S-transferase*) e da catalase (Roméo et al., 2003).

O mexilhão *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) foi usado como biomonitor, através do acompanhamento da expressão de P38/MAPK após exposição à Bisphenol A, PAH, Ftalato de dialilo (DAP, do inglês *Diallyl Phthalate*) (Burlando et al*.,* 2006). Foi utilizado também como modelo para acompanhamento da

bioacumulação de metais pesados em animais transplantados para a Baía de Ushuaia, Argentina (Giarratano et al., 2010). Já o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) foi utilizado como bioindicador em estudo de acompanhamento de elementos traços em miticultura na costa de Santa Catarina, Brasil (Curtius et al*.,* 2003). Esta mesma espécie também foi usada como modelo para o monitoramento da poluição por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na Baía da Guanabara, RJ, Brasil, através da técnica do vermelho neutro (Francioni et al., 2007), e como espécie chave para acompanhamento da contaminação bacteriológica em mitiilídeos na Baía da Guanabara, RJ, Brasil (Pereira, 2003).

1.11 **Foco da dissertação**

Este trabalho avalia a expressão de proteínas do sistema imune de esponjas marinhas (*Aplysina fulva* (Pallas 1766), *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862, *Dysidea robusta*, Vilanova e Muricy, 2001, *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) e *Hymeniacidon heliophila*) após exposição a lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria ou dodecil sulfato de sódio, e a letalidade em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) após exposição a Triton X-100™ ou esgoto doméstico *in natura.*

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo Geral**

Estabelecer ensaios de exposição a poluentes com esponjas marinhas e mexilhões com o objetivo de mimetizar perturbações naturais e antrópicas.

2.2 **Objetivos Específicos**

1. Avaliar a imunocompetência através da expressão de proteínas do sistema imune AIF-1 e pP38 por teste de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) em esponjas expostas a poluentes,
2. Acompanhar a expressão das proteínas AIF-1 e pP38 nas cinco espécies de esponjas marinhas: *Aplysina fulva*, *Chondrilla* aff. *nucula*, *Dysidea robusta*, *Polymastia janeirensis* e *Hymeniacidon heliophila* após exposição a lipopolisacarídeo (LPS) de *E. Coli*
3. Avaliar a expressão da proteína AIF-1 e pP38 nas espécies *Chondrilla* aff. *nucula* e *Polymastia janeirensis* após exposição a dodecil sulfato de sódio (SDS),
4. Avaliar a mortalidade de mexilhões quando expostos ao dispersante Triton X-100™ e esgoto doméstico *in natura*.

3 **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 **Experimentos com Porifera**

3.1.1 Espécies Estudadas

3.1.1.1 *Aplysina fulva* (Pallas, 1766)

A esponja marinha *Aplysina fulva* (Porifera: Demospongiae: Verongida: Aplysinidae) (Figura 2) tem morfologia muito variável, geralmente com vários ramos cilíndricos de diâmetro irregular (Muricy e Hajdu, 2006). A coloração vai de amarelo à marrom, com o interior mais claro. A espécie é abundante em costões expostos à luz, entre colônias de *Palythoa* sp. (Filo Cnidaria), em fundos cobertos de areia e ou dentro de tocas (Muricy e Hajdu, 2006). A espécie produz derivados de bromotirosina com atividade citotóxica e antimicrobiana (Muricy et al.,1993).

Figura 2 - *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), no Santuário Ecológico da Reserva Extrativista da Ilha do Cabo Frio, na Pedra Vermelha, Arraial do Cabo, R.J. O tamanho real aproximado é de 120 x 180 mm (Foto: Gisele Lôbo-Hajdu).

A espécie *A. fulva* ocorre no Caribe, Flórida, Bahamas, Ilhas Virgens, San Martin, Barbados, Cuba, Panamá, Colômbia, Curaçao, Bonaire e Venezuela e, no Brasil, nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Fernando de Noronha, Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Muricy e Hajdu, 2006).

3.1.1.2 *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862

Estudos moleculares demonstraram que *Chondrilla nucula* (Porifera: Demospongiae: Chondrosida: Chondrillidae) é um complexo de espécies, muito semelhantes morfologicamente, mas reprodutivamente isoladas e com distribuição mais restrita. No Brasil, há pelo menos cinco espécies distinguíveis apenas por métodos moleculares (Klautau et al., 1999).

As esponjas marinhas identificadas como *C.* aff. *nucula* (Figura 3) apresentam coloração marrom nas superfícies expostas à luz, porém, nas localidades onde há pouca luminosidade, a coloração é branca. Os indivíduos portadores de cianobactérias simbiontes têm coloração vinho na superfície. A forma é incrustante, a espessura da esponja pode variar de 2 centímetros (cm) até mais de 50 cm na sua maior largura. A superfície é muito lisa e a consistência cartilaginosa (Muricy e Hajdu, 2006).

Figura 3 - Chondrilla aff. *nucula* Schimidt, 1862 (Foto: Gisele Lôbo-Hajdu).

A espécie é muito abundante em rochas expostas ou protegidas da luz, da faixa entre-marés até 30 metros (m). É uma espécie eurióica (possui amplo limite de tolerância ecológica), sendo comum em diversos ambientes, suportando bem as variações ambientais. É um importante competidor por substrato em ambientes recifais (Muricy e Hajdu, 2006). O extrato da esponja apresenta uma mistura de antiinflamatórios, glicerol, ésteres e ácidos graxos (Berlinck, 2004) e atividade antimicrobiana (Muricy et al.,1993).

O complexo de espécie de *C. nucula* apresenta uma ampla distribuição biogeográfica no Oceano Atlântico (Klautau et al., 1999). No Brasil está presente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná (Muricy e Hajdu, 2006) Amapá, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Ilha da Trindade, e, também, em Atol das Rocas e Fernando de Noronha (Muricy et al., 2008).

3.1.1.3 *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001

A esponja marinha *Dysidea robusta* (Porifera: Demospongiae: Dictyoceratida: Dysideidae) (Figura 4) é encontrada em substrato rochoso coberto de areia na profundidade de 2 a 10 metros. A forma é maciça, lobada com até 40 cm x 20 cm de base por 15 cm de altura, os lobos são cilíndricos ou arredondados, fusionados lateralmente. Em vida a esponja tem cor cinza-amarronzada ou violácea (Muricy e Hajdu, 2006). Extratos ativos de esponjas do gênero *Dysidea apresentam* vários metabólitos secundários biologicamente ativos, terpenos, bromodifenil ésteres, peptídeos modificados, dicetopiperazina, aminoácidos incomuns e, menos freqüentemente, alcalóides (Seleghim, 2007).

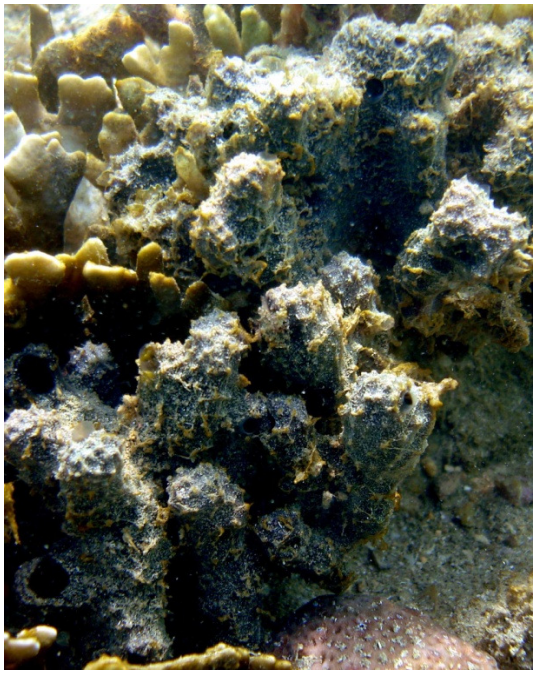

Figura 4 - *Dysidea robusta*, Vilanova e Muricy, 2001, no Parque Natural dos Corais, Praia da Tartaruga, Armação dos Búzios, R.J. O tamanho real aproximado é de 120 x 180 mm (Foto: Eduardo Hajdu).

A espécie é endêmica do Brasil ocorrendo nos estados do Rio de Janeiro e Bahia (Muricy e Hajdu, 2006).

3.1.1.4 *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910)

A esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Demospongiae Halichondrida: Halichondriidae) (Figura 5) apresenta coloração laranja viva *in situ*, varia de forma incrustante a maciça, e seu tamanho vai de 5 a 50 cm de comprimento por 1,5 a 3 cm de espessura, apresentando papilas cônicas com um ósculo na extremidade (Muricy e Hajdu, 2006). São freqüentemente encontradas na interface entre fundos rochosos e arenosos, em substrato consolidado, e possui normalmente a base coberta por areia deixando apenas as papilas expostas. Ocorrem desde a zona entre-marés até 15 m de profundidade (Muricy e Hajdu, 2006). Diversos metabólitos secundários com aplicabilidade farmacológica são conhecidos para esta esponja (Sennet et al., 1990).

Figura 5 - *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910), no costão, próximo ao Clube Costa Brava, Rio de Janeiro, R.J., a 3 metros de profundidade (Foto: Guilherme Muricy).

A distribuição geográfica de *H. heliophila* é no Atlântico tropical ocidental, ocorrendo desde a Carolina do Norte, nos Estados Unidos, até o estado de Santa Catarina, no Brasil (Lerner et al., 2005).

3.1.1.5 *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973)

A esponja marinha (Porifera: Demospongiae: Hadromerida: Polymastiidae) possui coloração externa marrom arroxeada escura, interna amarela esverdeada, tem forma incrustante espessa, base com até um centímetro de espessura e 30 cm de lado. Apresenta de 10 a 60 papilas delicadas, com até 5 cm de altura por 0,5 cm de diâmetro. Ocorre em rochas cobertas de areia, da qual se projetam apenas as papilas; na profundidade de 3 a 39 m (Muricy e Hajdu, 2006). Os extratos de *P. janeirensis* apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (Muricy et al., 1993) (Figura 6).

Figura 6 - *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973), na Prainha, em Arraial do Cabo, R.J. O tamanho real é de aproximadamente 60 x 90 mm (Foto: Gisele Lôbo-Hajdu).

A distribuição geográfica de *P. janeirensis* no Brasil é descontinua, tendo registros nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina.

3.1.2 Coleta e Transporte de Porifera

As esponjas foram coletadas em diferentes praias nos município de Armação dos Búzios e Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Figura 7).

Figura 7 - Mapa de localização das coletas de Porifera. Em destaque a linha da costa do estado do Rio de Janeiro.

As esponjas *A. fulva* e *D. robusta* foram coletadas no costão rochoso na Praia de João Fernandinho, (22°44'21.08"S, 41°52'26.19"O) no município de Armação dos Búzios, RJ, Brasil, (Figura 8).

Figura 8 - Vista aérea Praia de João Fernandinho, Armação dos Búzios, R.J. (www.buzios-exporer.com.br).

As espécies *P. janeirensis* e *C.* aff. *nucula* foram coletadas no costão rochoso e no fundo arenoso na Praia da Tartaruga, (22°45'18.13"S, 41°54'10.09"O) no município de Armação dos Búzios, R.J., Brasil, (Figura 9).

Figura 9 - Vista aérea da Praia da Tartaruga, atualmente parte do Parque Natural dos Corais, Armação dos Búzios, R.J. (www.buzios-explorer.com).

A espécie *H. heliophila* foi coletada no costão rochoso da Praia Vermelha (22°56'36.40"S, 43°09'20.88"O), no município do Rio de Janeiro, R.J., Brasil, (Figura 10).

Figura 10 - Foto do canto esquerdo da Praia Vermelha, Rio de Janeiro, R.J. (www.feriasbrasil.com.br).

As esponjas foram coletadas, retirando o indivíduo vivo inteiro do costão, com auxílio de uma faca, ou quando possível levando junto a pedra na qual o indivíduo estava fixado. Uma esponja coletada era considerada um indivíduo e para a coleta de outro indivíduo se mantinha uma distância mínima de pelo menos dois metros, para minimizar a coleta de indivíduos provenientes de reprodução clonal.

Os espécimes eram coletados e acondicionados em recipiente plástico, com água do mar, do momento da coleta até o transporte para o aquário. Os animais não eram expostos ao ar para reduzir o estresse da coleta e transporte até o laboratório na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), município do Rio de Janeiro, R.J. As amostras eram colocadas em aquário para aclimatação e manutenção até o momento de realização dos ensaios.

3.1.3 Aquário de Manutenção e Aclimatação das Esponjas

Para aclimatação e manutenção das esponjas antes dos ensaios *in vivo* foi realizada *a* montagem de um aquário marinho (Figura 11).

Figura 11 - Aquário marinho de 200 litros (L) para manutenção e aclimatação das esponjas.

Para a manutenção do aquário marinho foram monitorados o sistema de filtragem, iluminação, temperatura, e qualidade da água, que incluía: salinidade, pH e concentração de nitratos.

No aquário, foi utilizada, preferencialmente, água marinha natural coletada na Praia Vermelha, no bairro da Urca, RJ. Opcionalmente, para controle de salinidade e concentração de nitrato, foi utilizada água marinha artificial, preparada através da diluição de sal marinho comercial (*Coral life salt*) em água destilada. Trocas de 20% da água de cada aquário foram feitas mensalmente. A salinidade da água foi monitorada de modo indireto pelo acompanhamento da densidade através do densímetro (*Red Sea*). Métodos mais precisos para medir a salinidade são demasiadamente caros e o uso da densidade permite um monitoramento eficaz para

os fins deste trabalho. A temperatura da água foi acompanhada utilizando termômetro em fita, afixado na parte externa dos aquários. A colocação de um aparelho de ar condicionado na sala de manutenção dos aquários possibilitou a obtenção da temperatura ideal para o equilíbrio dos mesmos.

A iluminação escolhida foi artificial, sendo uma lâmpada branca de luz fluorescente (Boyu 20 Watts) e uma lâmpada *Coral Blue Life* (Degen 20 Watts). O sistema de filtragem utilizado foi o de filtro biológico, associada à *Protein Skimmer* (Boyu DT-2516), onde a movimentação da água era feita por bomba submersa (SarloBetter 2000 L/h). O pH e a concentração de nitratos foram acompanhados através de kits comerciais, Sera™ e Tetra teste™, respectivamente.

3.1.4 Ensaio de Imunocompetência

As esponjas marinhas foram expostas ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma) que é um componente da parede bacteriana que o sistema imune reconhece como bactéria (Thakur et al., 2005), sendo este produto sintético utilizado para mimetiza um ambiente rico em bactérias gram-negativas que é uma das características de um ambiente impactado por esgoto doméstico (Dizer e Hagendorf, 1991). Foi realizada também a exposição à dodecil sulfato de sódio (SDS) um surfactante como os utilizados para dispersar óleo em derramamentos (ITOPF, 20011).

Os ensaios para induzir ativação do sistema imune e posterior análise de expressão proteica foram realizados, segundo as etapas iniciais (Figura 12).

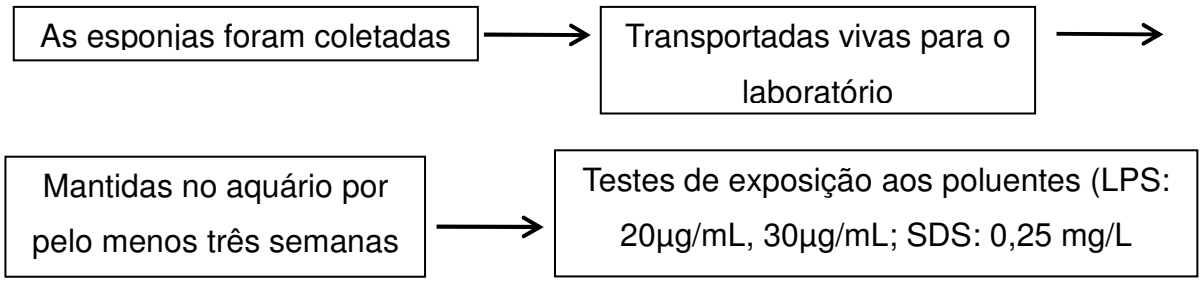

Figura 12 - Esquema das etapas iniciais para realização ensaios de exposição aos poluentes com esponjas.

Os ensaios foram realizados em tubos novos e autoclavados de polipropileno com fundo cônico, do tipo Falcon de 50 mililitros (mL), com volume final de 50 mL e a aeração realizadas por bombas de ar (SarloBetter 350) (Figura 13 A-E).

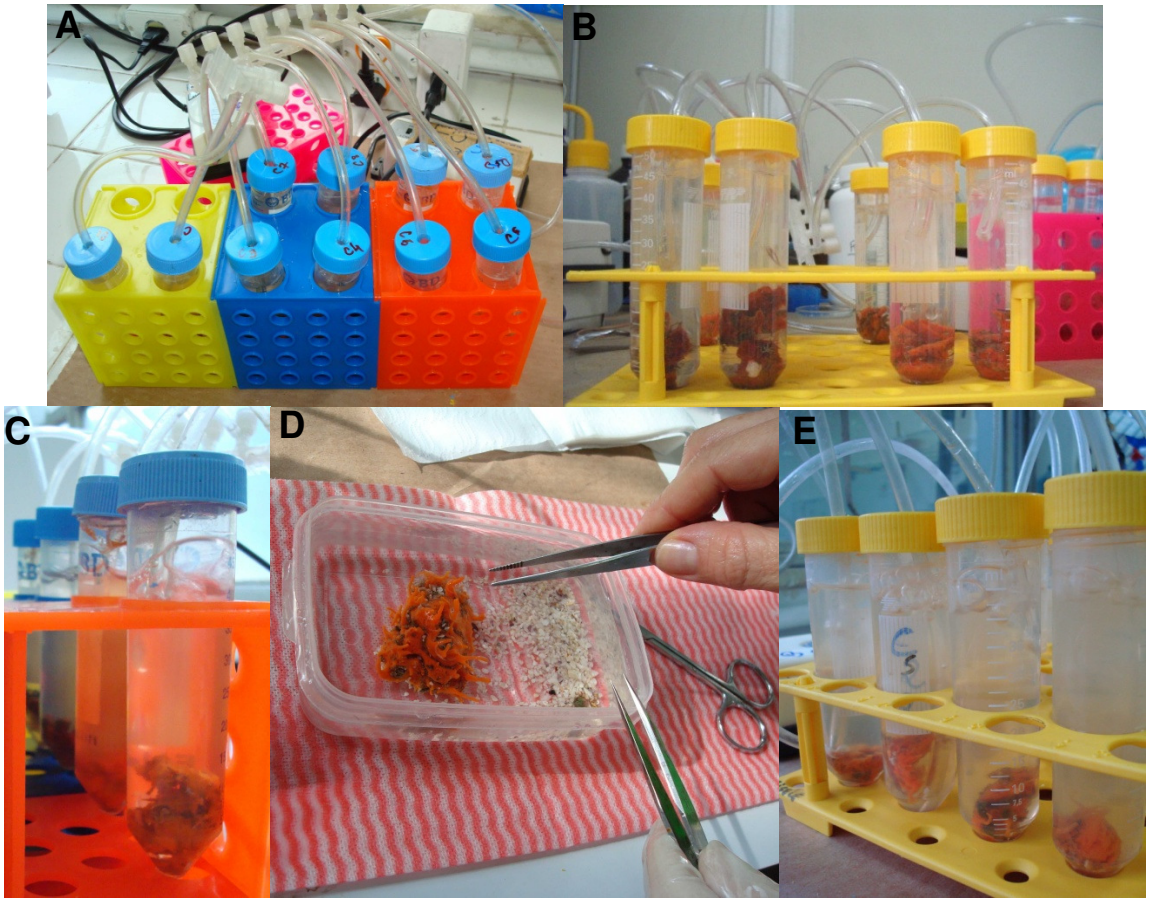

Figura 13 - Esponjas em ensaios de imunocompetência. **A-C e E**: Esponjas em tubos de 50 mililitros com aeração, **D**: esponja sendo partida em pedaços para colocação nos tubos de ensaio.

3.1.5 Passos para a Realização da Exposição aos Poluentes

As esponjas foram expostas a LPS e a SDS. A imunocompetência foi avaliada através da expressão das proteínas AIF-1 e pP38 por teste de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Figura 14).

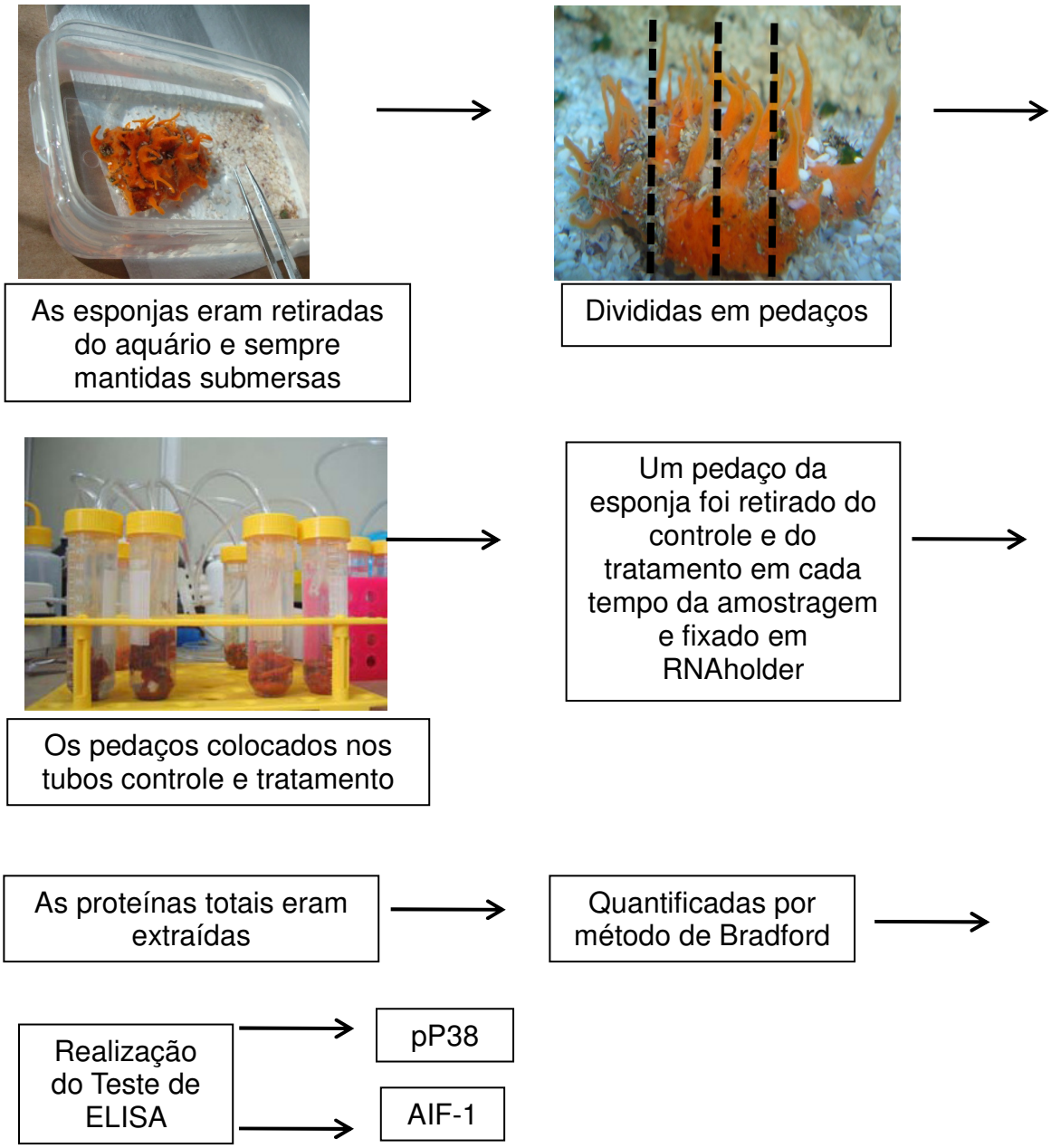

Figura 14 - Esquema de passos da exposição das esponjas ao lipopolissacarídeo e ao dodecil sulfato de sódio.

3.1.6 Experimentos de Exposição ao Poluente

3.1.6.1 Exposição ao LPS em quatro espécies de esponjas marinhas: *Aplysina fulva*, *Chondrilla* aff. *nucula*, *Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis*

As esponjas *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula, Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis* foram expostas a 20 µg/mL de LPS diluído em água proveniente do próprio aquário em que estavam aclimatizadas, o controle foi feito com somente água do aquário. O número amostral foi dois para cada espécie. As esponjas foram retiradas do aquário e cada uma foi partida em 10 pedaços que foram divididos igualmente em dois tubos 10 pedaços: um sendo o tratamento de exposição ao LPS e o outro, o controle. Um pedaço de esponja de cada tubo (tratamento e controle) era retirado após 30 minutos (min), uma hora (h), três horas, 24 h e 48 h de exposição. Em seguida, os fragmentos das esponjas eram fixados em RNAholder™ (uma solução salina comercial capaz de estabilizar proteínas) e mantidas no freezer à –20°C até as análises de expressão proteica (Figura 15). Os tempos de exposição foram definidos com base em experimentos anteriores.

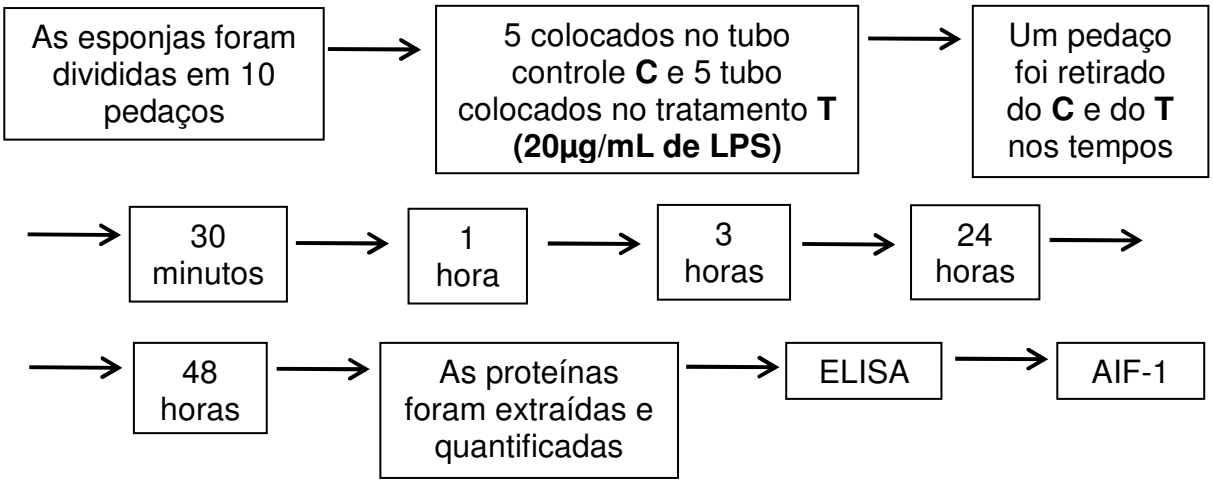

Figura 15 - Esquema da exposição de *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862, *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001 e *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) a lipopolissacarídeo (LPS) (C=Controle e T= Tratamento).

3.1.6.2 Exposição ao Lipopolisacarídeo na espécie *Hymeniacidon heliophila*

Para a esponja *H. heliophila* foram realizados dois ensaios diferentes um de exposição curta e outro de exposição longa a 30 µg/mL de LPS diluído em água do aquário e o controle era feito com somente água do aquário. A concentração de LPS utilizada e os tempos de exposição foram definidos com base em experimentos realizados anteriormente (Sereno, 2010).

3.1.6.2.1 Exposição curta

As esponjas foram retiradas do aquário e cada uma foi dividida em oito pedaços e os pedaços foram colocados nos tubos de tratamento e nos tubos controle. Os fragmentos foram retirados nos tempos de 30 min, uma hora, três horas e quatro horas (Figura 16). As amostras foram fixadas em RNAholder™ e mantidas no freezer à – 20°C O número amostral foi cinco para AIF-1 e oito para pP38.

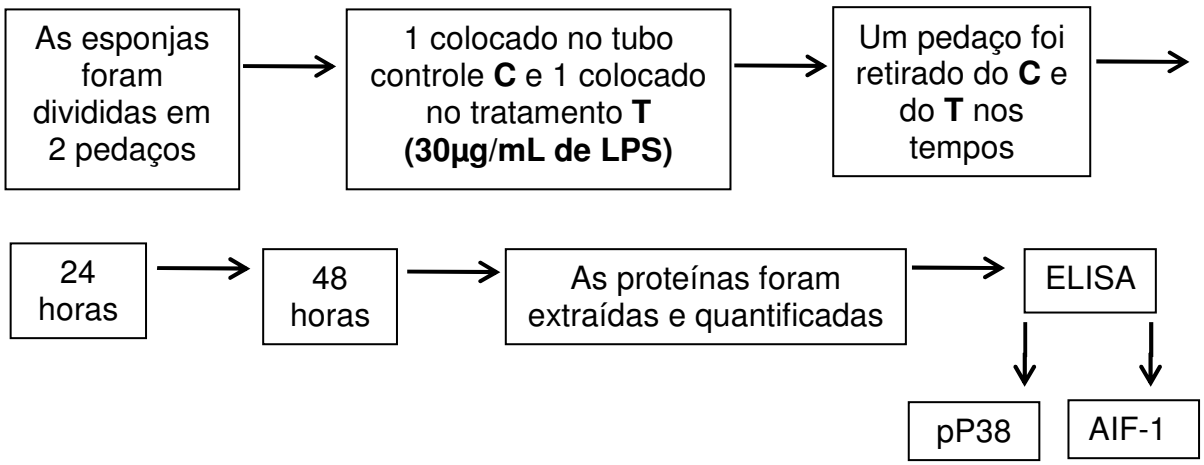

Figura 16 - Esquema da exposição curta de *Hymeniacidon heliophila* (Parker 1910) a lipopolissacarídeo (LPS) (C=Controle e T= Tratamento).

3.1.6.2.2 Exposição longa

As esponjas foram retiradas do aquário e divididas em quatro pedaços dois colocados nos tubos de tratamento e dois nos tubos controle. Os fragmentos foram retirados nos tempos de 24 horas e 48 horas (Figura 17). As amostras foram fixadas e estocadas como descrito anteriormente. O número amostral foi quatro para AIF-1 e três para pP38.

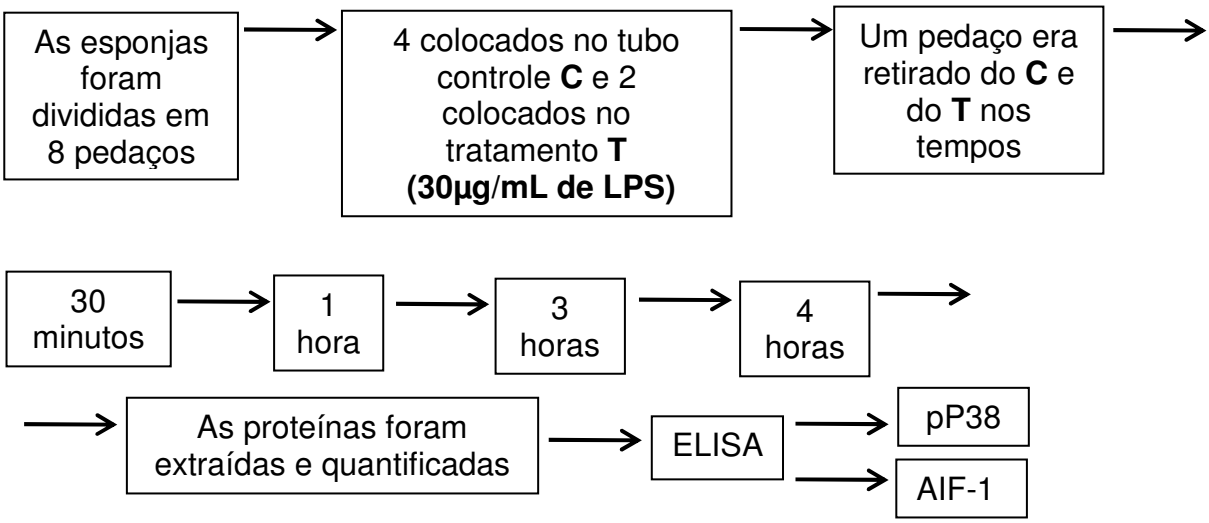

Figura 17 - Esquema da exposição longa de *Hymeniacidon heliophila* (Parker 1910) a lipopolissacarídeo (LPS) (C=Controle e T= Tratamento).

3.1.6.3 Exposição das esponjas *Chondrilla* aff. *nucula* e *Polymastia janeirensis* a dodecil sulfato de sódio (SDS)

As esponjas *Chondrilla* aff. *nucula* e *Polymastia janeirensis* foram expostas a 0,25 mg/L de dodecil sulfato de sódio (SDS) diluído em água proveniente do próprio aquário em que estavam aclimatizadas o controle foi feito com água do aquário. O número amostral foi dois para *C.* aff. *nucula e* três para *P. janeirensis*. As esponjas foram retiradas do aquário, acondicionadas em potes plásticos e divididas em quatro pedaços. Dois pedaços foram colocados nos tubos de tratamento e os outros dois nos tubos controle. Os fragmentos foram retirados nos tempos de 24h e 48 horas (Figura 18). As amostras foram fixadas em RNAholder™ e estocadas como descrito anteriormente.

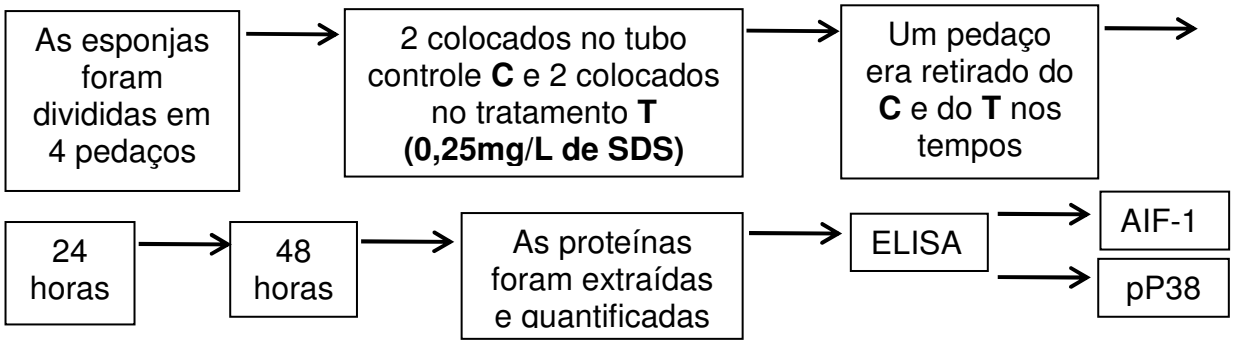

Figura 18 - Esquema da exposição de *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 e *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) a dodecil sulfato de sódio SDS (C=Controle e T= Tratamento).

3.1.7 Extração de proteínas

Para a realização dos testes de expressão de proteínas, é necessária a extração das proteínas totais do tecido.

Para tal, um pequeno pedaço da amostra com aproximadamente um centímetro foi cortado e colocado em um microtubo plástico, do tipo Eppendorff, de 1,5 mL. Um volume de 540 microlitros (µL) do tampão de extração, composto de TBS 1X (do inglês *Tris Buffered Saline*, 50 mM Tris + 150 mM NaCl, pH 7.5) + EDTA 1 mM e também 60 µL de coquetel inibidor de proteases (Roche) 10X foram adicionados e a amostra foi macerada com auxílio de pistilos plásticos. Todo o procedimento foi realizado sobre gelo.

Após a maceração, as amostras foram centrifugadas, a 4°C, por 10 minutos, sob 13.000 r.p.m. (em microcentrífuga Eppendorf 5471 R). O sobrenadante foi, então, colocado em outro microtubo de 1,5 mL sendo centrifugado mais de uma vez nas mesmas condições citadas anteriormente. Se após a segunda centrifugação as amostras estivessem límpidas não era necessário repetir o processo, estando prontas para a dosagem de proteínas. Após cada extração as amostras eram colocadas à –20°C para posterior quantificação.

3.1.8 Quantificação das amostras

O objetivo da quantificação é verificar qual a concentração de proteínas totais após o procedimento de extração, a fim de padronizar os testes de expressão.

As amostras foram quantificadas por meio do método de Bradford, utilizando um kit comercial (Bioagency™; Bradford, 1976). O reagente de Bradford para sua utilização foi diluído na proporção de 1:4 em água destilada. Primeiramente, foi feita uma curva de titulação, com várias concentrações de albumina de soro bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich ™). As diluições seriadas utilizadas foram: 1.000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg e 0 microgramas (µg). A reação consistia em adicionar 10 µL de cada diluição a 500 µL de reagente de Bradford em microtubos de 1,5 mL. Após 10 minutos de reação, a absorbância de cada concentração era medida em microplaca de 96 poços (Linbro/Titertek, Flow Laboratories, Inc.) utilizando um espectrofotômetro (Teckhand Coulter DTX 800), ajustado para 595 nanômetros (nm) de comprimento de onda. Cada leitura no espectrofotômetro era feita em duplicata (Figura 19).

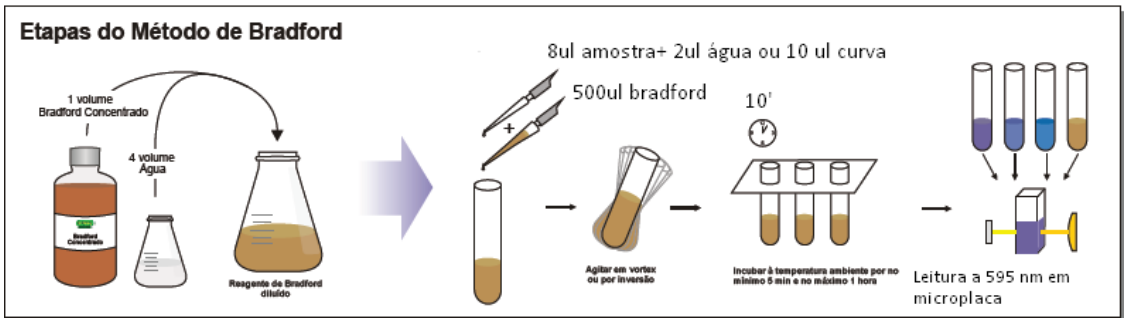

Figura 19 - Esquema das etapas do método de Bradford (modificado de www.bioagency.com.br).

As concentrações de cada titulação foram calculadas através da conversão dos valores de absorção para concentração, utilizando a curva de regressão do teste de titulação com o BSA. Para se obter uma quantificação precisa após cada extração, a curva entre as concentrações de BSA e as absorções precisava ter um coeficiente r^2 mínimo de 0,98 (Figura 20).

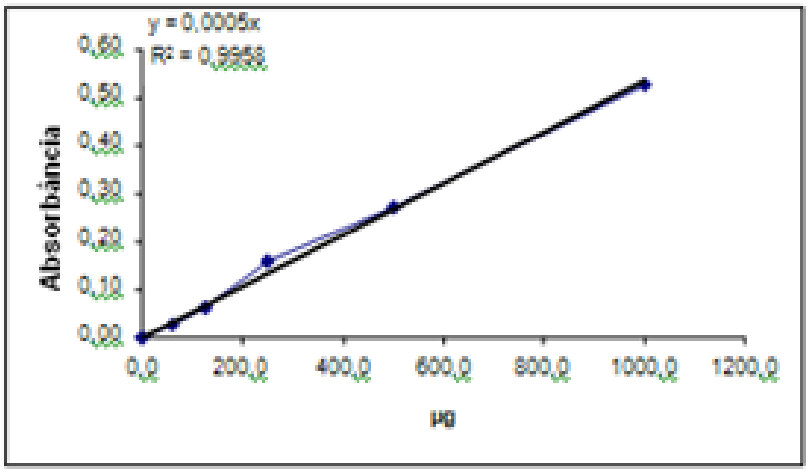

Figura 20 - Exemplo de curva BSA para quantificação por teste de Bradford.

Para a quantificação da concentração de proteínas, foram adicionados 2 µL de cada amostra diluída 5X + 8 µL de água destilada e 500 µL de reagente de Bradford em microtubos de 1,5 mL. A leitura foi realizada, em microplaca (Linbro/Titertek-Flow laboratories) de 96 poços, após 10 min. Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata e as absorbâncias comparadas com a curva de titulação. As concentrações em µg eram calculadas com base no valor da absorção a 595 nanômetros. Após a quantificação as amostras foram colocadas em freezer à – 20°C para posterior análise de expressão.

3.1.9 Expressão de proteínas

Para a análise da expressão das proteínas relacionadas à resposta imune foram feitos ensaios de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Figura 21).

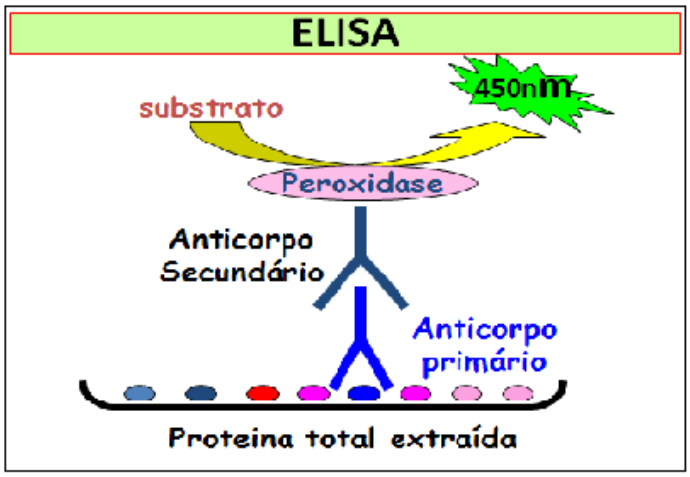

Figura 21 - Esquema do teste de ELISA (modificado de Amelie Châtel, Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

O ensaio de ELISA foi realizado em microplaca com 96 poços (Coastar 3590), em um volume total de 100 µL de uma solução contendo as amostras diluídas para a concentração desejada em PBS 1X (do inglês, *Phosfate Buffered Saline*, NaCl 137 mM + KCl 3 mM + Na_2HPO_4 20mM + KH_2PO_4 2mM, pH 7,4), utilizando os valores obtidos na quantificação protéica por Bradford. O branco da reação foi feito somente com PBS 1X.

As amostras foram incubadas na placa por 24 horas, sendo uma hora em agitador orbital (Hoefer) e o resto do tempo, na geladeira a 4°C. Após a incubação, toda a solução na placa foi descartada e três lavagens de um minuto cada com o tampão PBS-T (PBS 1X + Tween-20 0,05%) foram feitas. Para bloquear ligações inespecíficas, cada placa foi incubada por 24 horas com BSA 3% sendo uma hora em agitador orbital (Hoefer) e o resto do tempo, na geladeira a 4°C. Após o bloqueio, a solução foi descartada e as placas foram lavadas com o tampão PBS-T três vezes por um minuto.

Após as lavagens as placas foram incubadas com o anticorpo primário específico para cada experimento (pP38 ou AIF-1), diluído em PBS 1X com 0,3% de BSA, por duas horas e 30 minutos, em estufa a 29°C. Após a incubação, a solução foi descartada e a placa foi lavada três vezes por um minuto com o tampão PBS-T. Posteriormente, foi feita a incubação da placa com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase e específico para cada experimento (*HRP anti-goat para AIF-1* ou *HRP anti-rabbit para pP38*), diluído em PBS 1X com 0,3% de BSA, por duas horas e

30 min, em estufa a 29°C. Após a segunda incubação, a solução foi descartada e as placas foram novamente lavadas com tampão PBS-T, três vezes por um minuto.

O processo de revelação usou o 3,3,5,5-tetrametilbenzidino (TMB, kit comercial de revelação KPL) como substrato para a peroxidase, seguindo as recomendações do fabricante. Em cada poço da microplaca foi adicionado 100 µL de solução reveladora (duas soluções do kit TMB misturadas na proporção de 1:1) e incubados no escuro por 10 min. Após este tempo, a reação de revelação era interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 2 mM. A absorbância da solução, resultado da reação de revelação foi lida à 450 nm em espectrofotômetro (Teckhand Coulter DTX 800).

Os testes de ELISA foram feitos com cinco µg de proteína total para as espécies *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula, Dysidea robusta, Polymastia janeirensis e Hymeniacidon heliophila* com o anticorpo primário AIF-1 (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:500 e anticorpo secundário HRP *anti--goat* (Zymed) na diluição de 1:1000. Para *H. heliophila* também houve ensaios de ELISA para a proteína pP38 (Santa Cruz Biotechnology), com o anticorpo primário pP38 na diluição de 1:500 e anticorpo secundário HRP- *anti-rabbit* (Zymed) na diluição de 1:1000. As absorbâncias foram comparadas entre as amostras do controle e do tratamento.

3.1.10 Análises estatísticas

As análise estatísticas foram realizadas no programa MyStat (Systat Software Inc). Foram feitos testes de normalidade tipo K-S (Kolmogorov Smirnov) modelo Lillifors. Teste de Levene para testar a homogeneidade das variâncias. Mesmo quando os dados não eram normais, a opção foi por um teste paramétrico, pois Underwood (1997) afirma que as análises paramétricas possuem maior poder de avaliação. A análise estatística não pôde ser realizada para os ensaios de exposição a 20 µg/mL de LPS das espécies *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula, Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis* devido a um número amostral reduzido (N=2). Para analisar a expressão de AIF-1 e pP38 em *Hymeniacidon heliophila* exposta a 30 µg/mL foi realizado Análise Bifatorial de Variância. Para a expressão de AIF-1 nas amostras de *Hymeniacidon heliophila* no ensaio de exposição à LPS foi aplicado o Teste t entre tratamento e controle.

3.2 **Experimentos realizados com Mollusca**

3.2.1 Espécie estudada *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

O molusco *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) (Figura 22) é uma espécie comum na costa brasileira, sendo mais abundante entre os estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina, mas ocorrendo também no Espírito Santo e Rio Grande do Sul (Fernandes et al., 2008). Esta espécie apresenta uma ampla distribuição na Costa Atlântica da América do Sul e ocorre também na África do Sul (Rios, 1994), Caribe e Ilhas Canárias (Nordsieck, 1969).

Figura 22 - Mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em um costão rochoso (www.blogspot.pescaemar.com.br).

Esses animais vivem principalmente fixos aos costões rochosos, na região de entre-marés (Ferreira e Magalhães, 2003) tendo grande importância ecológica, pois criam condições para o estabelecimento de diversas espécies e removem grande quantidade de material em suspensão da coluna de água (Seed,1976).

Externamente, os mexilhões são constituídos por duas conchas calcárias, ou valvas, as quais encerram o corpo propriamente dito. Os *P. perna* não apresentam dimorfismo sexual externo (Marques, 1998). Além disso, a espécie é estritamente dióica, iniciando a maturação geralmente aos dois centímetros de comprimento e tendo a sua primeira desova em torno dos cinco centímetros (Ferreira et al., 2006). A fecundação é externa e ocorre no ambiente aquático (Marques, 1998).

A espécie *Perna perna,* como outros bivalves da família Mytilidae, é empregada em larga escala na alimentação humana com sabor e grande conteúdo de carne (Carmo *et al*, 1984). Desta forma, o cultivo de moluscos é responsável por 22% da produção aquícola mundial e a espécie *Perna perna* é bastante importante economicamente (Ferreira e Magalhães, 2003).

3.2.2 Coleta e transporte de Mollusca

Os mexilhões foram coletados nos espinhéis de cultivo da Fazenda Marinha Vila Dois Rios, ou Fazenda Marinha do Centro de Estudos e Desenvolvimento Sustentável (CEADS) (23°10'59.26"S, 44°10'58.58"O) que fica situada em Vila Dois Rios, Ilha Grande, município de Angra dos Reis, estado do Rio de Janeiro, Brasil), e foi estabelecida por pesquisadores cadastrados no Centro de Estudos e Desenvolvimento Sustentável (CEADS) da UERJ (Figura 23). Os mexilhões foram transportados a seco para o laboratório no CEADS onde foram realizados os ensaios de exposição aos poluentes em aquário. Os mexilhões eram coletados aproximadamente 30 minutos antes de cada procedimento de exposição.

Figura 23 - Mapa de localização das coletas de Mollusca.

3.2.3 Experimentos de Exposição ao Poluente

3.2.3.1 Ensaio de exposição dos mexilhões ao Triton X-100™ - avaliação de mortalidade

O objetivo do ensaio foi acompanhar a mortalidade dos animais após a exposição a um detergente não iônico, pois este produto é utilizado em ambientes marinhos como dispersante de óleo em derramamentos (ITOPF, 20011). Há dados da literatura que sugerem alteração da filtração induzida por detergentes (Kramer et al., 1989). O detergente utilizado foi o Triton X-100 ™ (MERCK).

O ensaio foi realizado em aquários com 40 litros (L) de água do mar, coletada em frente ao CEADS, obedecendo a concentração de um mexilhão para cada 4 L de água. A circulação da água foi feita com bomba submersa (SarloBetter 650 Litros/hora). Estes princípios foram seguidos no aquário controle, com somente água do mar, e no aquário tratamento. Um volume de 3,8 mL de Triton X-100 (0,10 g/L) foi adicionado no aquário tratamento, sendo misturado com a própria bomba, por cinco minutos. Um total de N=160 mexilhões foram divididos por quatro tempos de exposição ao detergente, sendo utilizados, em cada tempo, N=20 mexilhões nos aquários controles e N=20, nos experimentais (Figura 24)

A mortalidade dos mexilhões foi avaliada após três, seis, 12 e 18 horas de exposição ao Triton X-100™, foram considerados mortos os animais que após um leve toque de bisturi no manto fecharam as valavas. Após cada tempo de exposição os aquários controle e tratamento foram lavados e remontados com água nova e mexilhões recém - coletados.

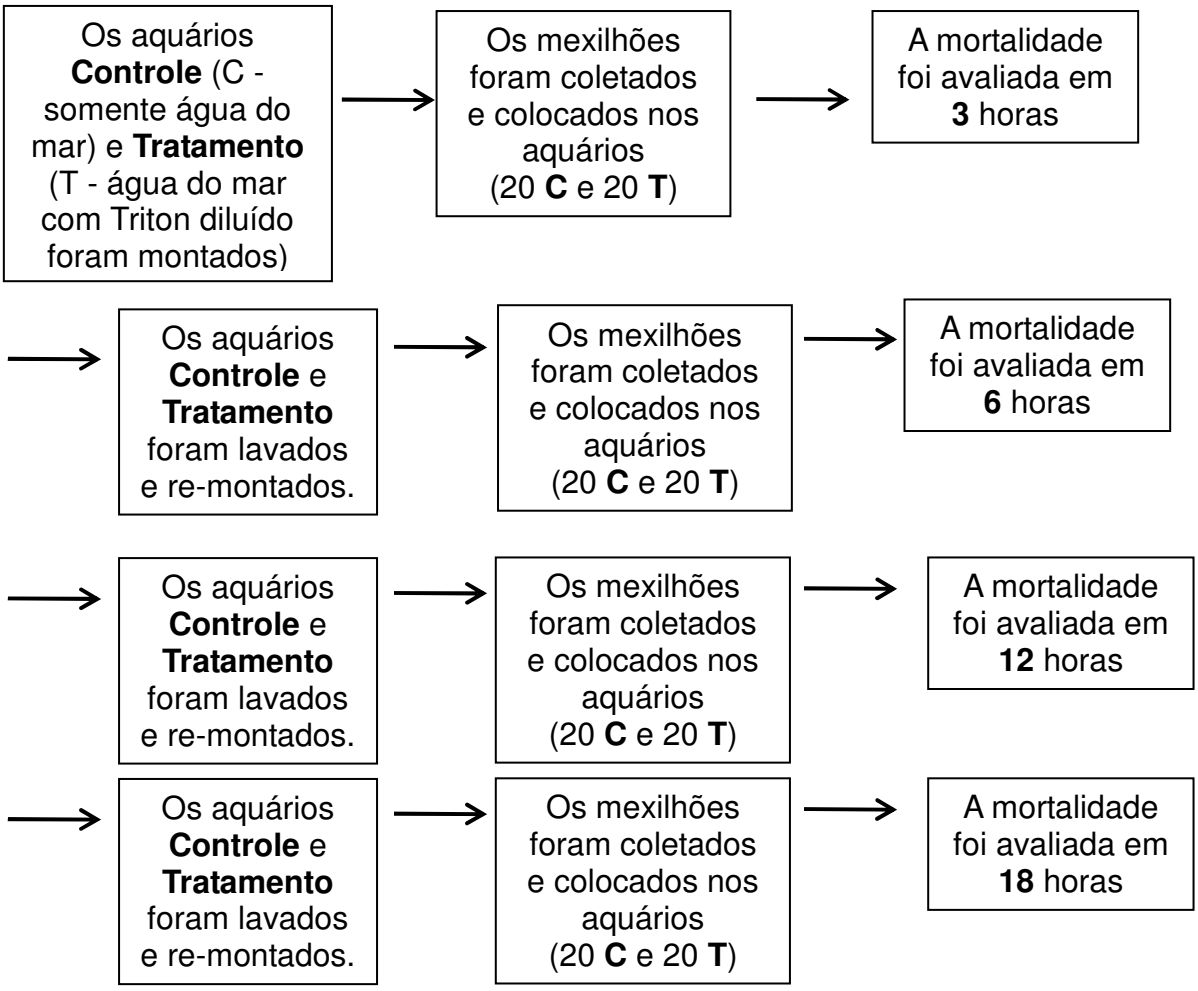

Figura 24 - Esquema da exposição de *Perna perna (*Linnaeus, 1758) a Triton X-100™.

3.2.3.2 <u>Ensaio de exposição dos mexilhões a esgoto doméstico *in natura* - avaliação de mortalidade</u>

O objetivo do ensaio foi acompanhar a mortalidade dos animais após a exposição a esgoto doméstico *in natura,* pois esgoto doméstico é uma grande fonte de poluição para os ecossistemas costeiros (Akaishi, 2007) e a concentração de esgoto utilizada é a taxa de diluição encontrada em plumas de emissários submarinos (Ramos, 2004). O esgoto *in natura* foi coletado na estação de tratamento de esgoto do CEADS (Figura 25A e 25B).

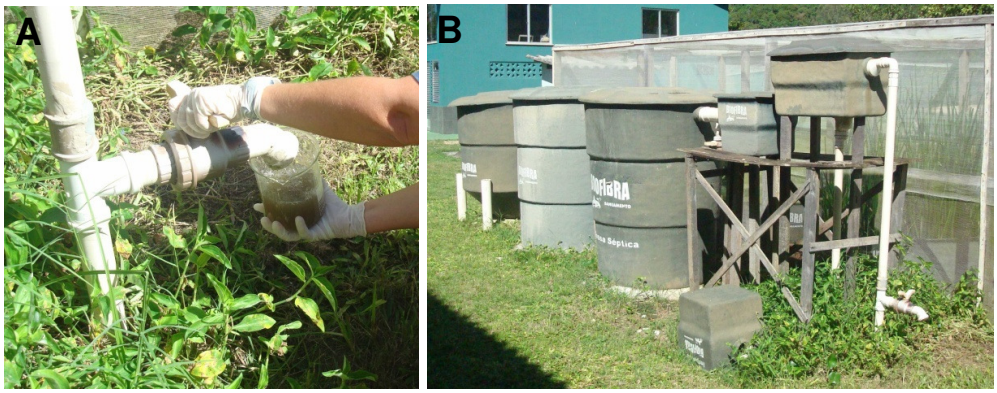

Figura 25 - **A:** Esgoto doméstico *in natura* coletado na estação de tratamento de esgoto do CEADS (**B**).

O ensaio foi realizado em aquários com 40 litros (L) de água do mar, coletada em frente ao CEADS, obedecendo a concentração de um mexilhão para cada 4 L de água. A circulação da água foi feita com bomba submersa (SarloBetter 650 Litros/hora). Estes princípios foram seguidos no aquário controle, com somente água do mar e no aquário tratamento. O esgoto foi adicionado no aquário tratamento na proporção de uma parte de esgoto para 50 partes de água, sendo misturado com a própria bomba, por cinco minutos. Um total de N=140 mexilhões foram divididos por sete tempos de exposição ao esgoto, sendo utilizados, em cada tempo, N=10 mexilhões nos aquários controles e N=10, nos experimentais.

A mortalidade dos mexilhões foi avaliada após três, seis, 12, 18, 24, 36 e 48 horas de exposição ao esgoto, foram considerados mortos os animais que após um leve toque de bisturi no manto fecharam as valavas. Após cada ensaio de exposição temporal o aquário foi remontado, para iniciar novamente o experimento com uma nova coleta de mexilhão e nova exposição ao esgoto (Figura 26).

3.2.4 Análises estatísticas

Para os ensaios de exposição de *Perna perna* a 0,10 g/L de Triton X-100™ foi feita a avaliação da dependência dos tratamentos por Teste de Qui-quadrado pareado (controle e tratamento) no Excel 2007® e para a exposição de *Perna perna* não foi feita análise estatística pois não houve diferença entre tratamento e controle.

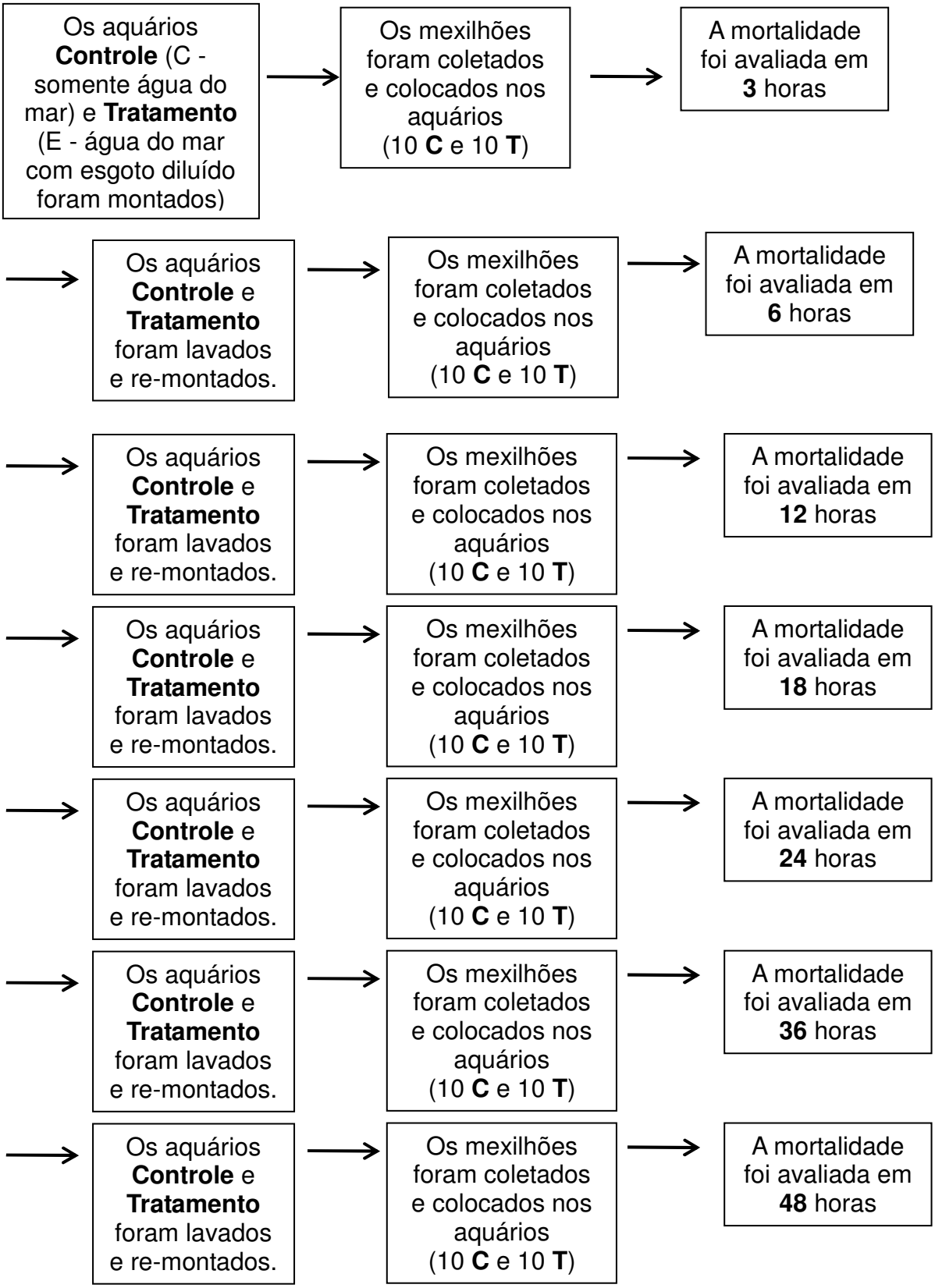

Figura 26 - Esquema da exposição de *Perna perna (Linnaeus, 1758)* esgoto doméstico *in natura.*

4 **RESULTADOS**

4.1 **Resultados referentes à Porifera**

4.1.1 Porifera expostos à Lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria

Em todos os experimentos de exposição a 20 µg/mL LPS não foram realizadas análises estatísticas porque o tamanho amostral foi reduzido (N=2).

4.1.1.1 Espécie *Aplysina fulva* (Pallas, 1766)

A esponja *Aplysina fulva* foi exposta a 20 µg/mL de LPS. Foi observada uma maior expressão de AIF-1 nos indivíduos expostos ao LPS por 48 horas quando comparados com o grupo controle (Gráfico 1).

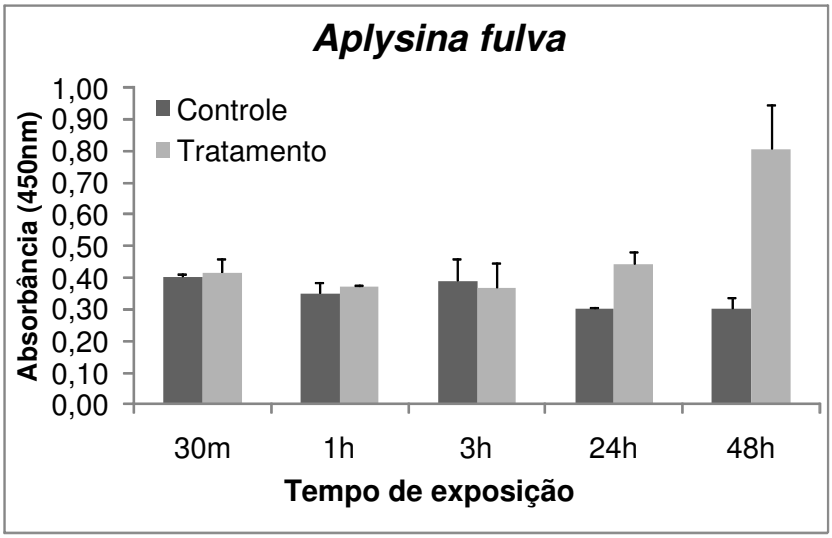

Gráfico 1 - Expressão da proteína AIF-1 em *Aplysina fulva* (Pallas, 1766), exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento.

4.1.1.2 Espécie *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862

A esponja *Chondrilla* aff. *nucula* foi exposta a 20 µg/mL de LPS. Porém, pôde-se observar uma maior expressão de AIF-1 nas esponjas tratadas com LPS quando comparadas com o controle. A expressão de AIF-1 foi mais alta no tratamento após 30 minutos de exposição ao LPS. Porém, a maior expressão de AIF-1 relativa ao controle foi observada somente após 48 horas de exposição ao LPS (Gráfico 2).

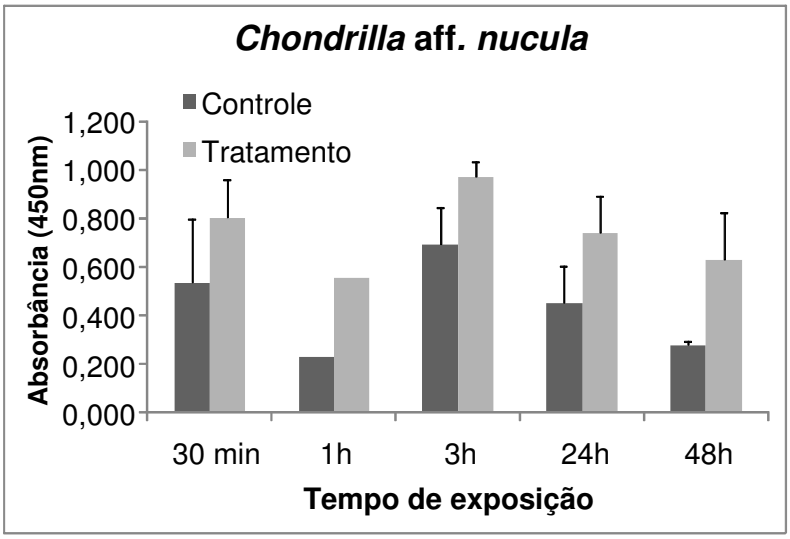

Gráfico 2 - Expressão da proteína AIF-1 em *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. No tempo de exposição de 1 hora, somente um individuo foi amostrado.

4.1.1.3 Espécie *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001

A esponja *Dysidea robusta* foi exposta a 20 µg/mL de LPS. Observou-se uma pequena expressão de AIF-1 após 30 minutos de exposição ao LPS em relação ao controle, porém, em todos os outros períodos não visualizamos diferença na expressão de AIF-1 (Gráfico 3).

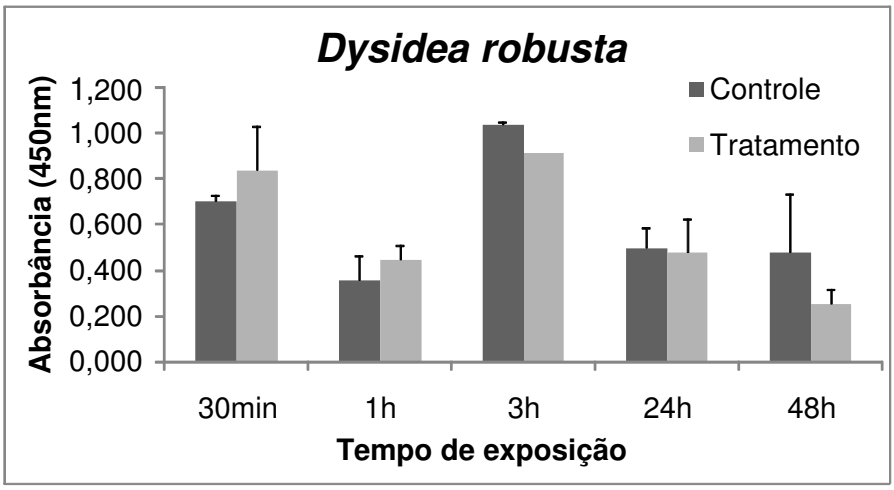

Gráfico 3 - Expressão da proteína AIF-1 em *Dysidea robusta* Vilanova e Muricy, 2001 exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. No tempo de exposição de 3 horas, somente um individuo foi amostrado para LPS.

4.1.1.4 Espécie *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973)

A esponja *Polymastia janeirensis* foi exposta a 20 µg/mL de LPS. Nesta espécie, foi observada uma maior expressão após uma hora de exposição ao LPS em relação ao controle (Gráfico 4).

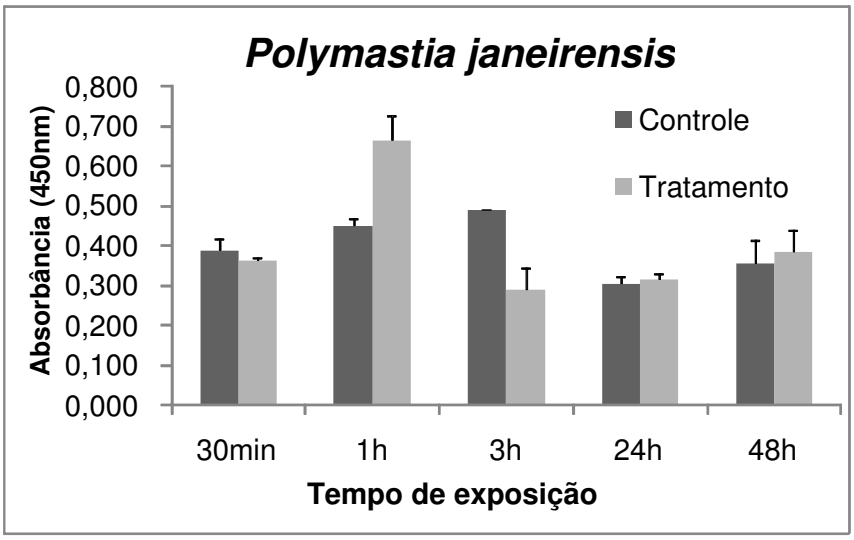

Gráfico 4 - Expressão da proteína AIF-1 em *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) exposta a 20 µg/mL de LPS em cinco tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento.

4.1.1.5 Espécie *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910)

4.1.1.5.1 Avaliação da expressão de AIF em tempos curtos

A esponja *Hymeniacidon heliophila* foi exposta a 30 µg/mL de LPS por 30 minutos, uma hora e quatro horas. As amostras apresentaram distribuição normal e as variâncias foram homogêneas. Na expressão de AIF-1 houve diferença significativa entre o tratamento e controle (F=7,048; GL=1; P=0,014), mas, não entre os diferentes tempos de exposição (F=1,166; GL=2; P=0,329), a diferença de expressão do AIF-1 entre os tratamentos não foi dependente do tempo de exposição, pois a interação não foi significativa (F=1,879; GL=2; P=0,175) (Gráfico 5). Testes T individuais (controle e tratamento) para cada tempo mostrou que a diferença significativa encontrada entre tratamento e controle era devido à alta expressão de AIF-1 em esponjas após 4h de exposição ao LPS (T= 8,871; GL= 1,8; P= 0,018). Análises estatísticas entre tratamento e controle nos outros tempos de exposição não foram significativos (dados não apresentados).

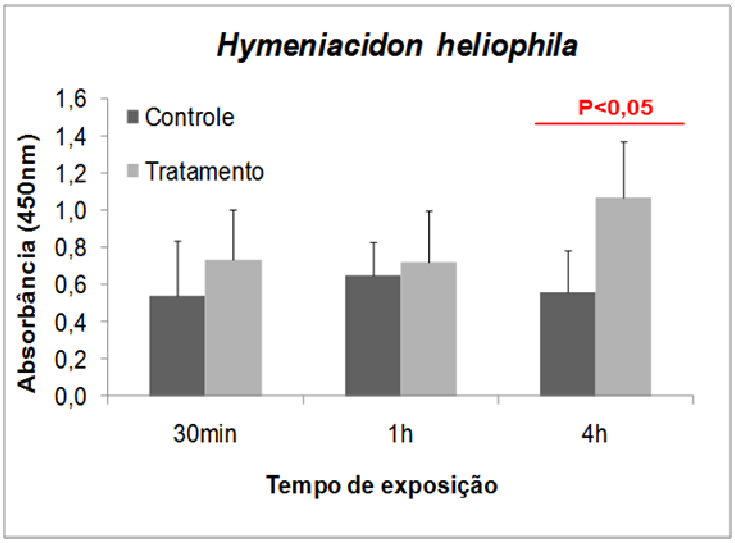

Gráfico 5 - Expressão da proteína AIF-1 em *Hymeniacidon* heliophila (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em três tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. A barra horizontal indica em qual tempo de exposição à expressão de AIF-1 foi significativamente diferente entre controle e tratamento.

4.1.1.5.2 Avaliação da expressão de AIF em tempos longos

A esponja *H. heliophila* foi exposta a 30 µg/mL de LPS por 24 e 48 horas. As amostras apresentaram distribuição normal e as variâncias foram homogêneas. Houve diferença significativa na expressão de AIF-1 entre o tratamento e o controle (F=17,731; GL=1; P=0,001), e entre os tempos de exposição (F=12,169; GL=1; P=0,004). A interação foi significativa entre o tratamento e o tempo de exposição (F=17,176; GL=1; P=0,001), indicando que a diferença na expressão de AIF-1 entre tratamento e controle está relacionada ao tempo de incubação (Gráfico 6). Testes T independentes para cada tempo de exposição mostraram que só houve diferença significativa entre tratamento e controle após 24h de exposição (T= 31,45; GL= 1,6; P= 0,001), mas esta expressão diminuiu após 48h de exposição (T= 0,002; GL= 1,6; P= 0,962).

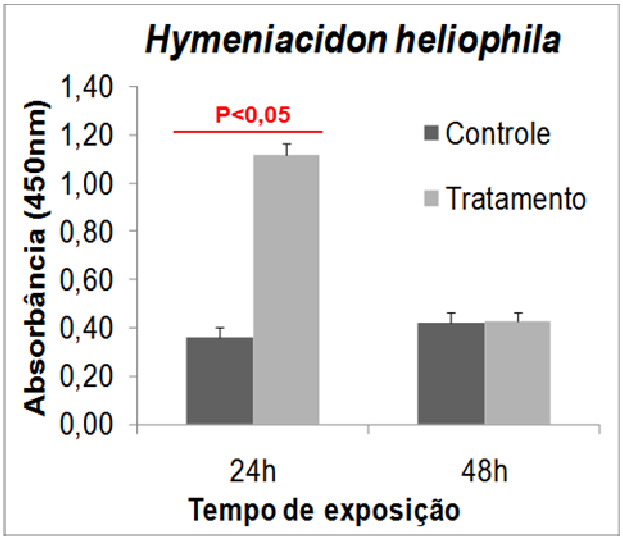

Gráfico 6 - Expressão da proteína AIF-1 em *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em dois tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erros padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. A barra horizontal indica em qual tempo de exposição a expressão de AIF-1 foi significativamente diferente entre controle e tratamento.

4.1.1.5.3 Avaliação da expressão de pP38 em tempos curtos

A esponja *H. heliophila* foi exposta a 30 µg/mL de LPS por 30 minutos, uma hora e quatro horas. As amostras não apresentaram distribuição normal, embora as variâncias estivessem homogêneas. Foi realizado um teste de ANOVA bifatorial que demonstrou que não há diferença significativa na expressão de pP38 entre o tratamento e o controle (F=0,056; GL=1; P=0,815). Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição (F=0,057; GL=2; P=0,577) e na interação tempo e tratamento (F=0,286; GL=2; P=0,753) (Gráfico 7).

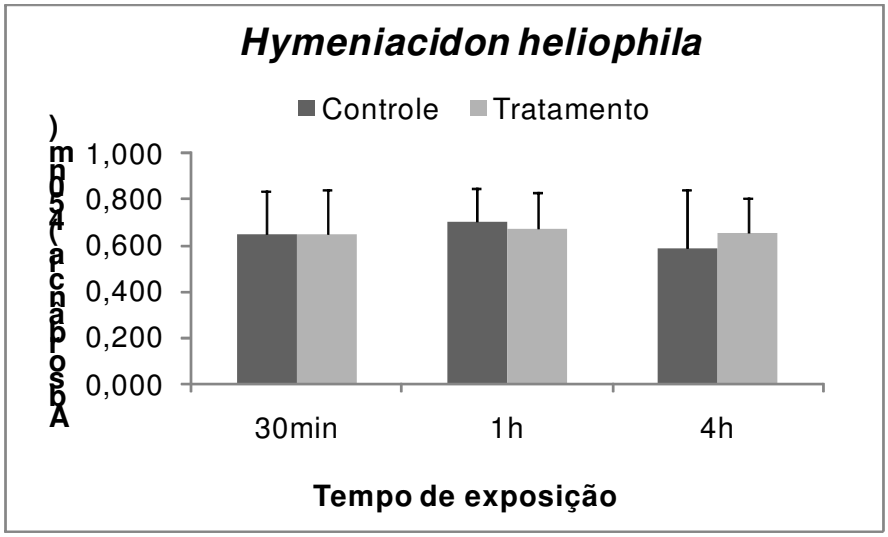

Gráfico 7 - Expressão da proteína P38 fosforilada (pP38) em *Hymeniacidon* heliophila (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em três tempos de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erro padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento.

4.1.1.5.4 Avaliação da expressão de pP38 em tempos longos

A esponja *H. heliophila* foi exposta a 30 µg/mL de LPS por 24 e 48 horas. As amostras apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias. Não houve diferença significativa na expressão de pP38 entre o tratamento e controle (F=1,816; GL=1; P=0,215), entre os tempos de exposição (F=1,401; GL=1; P=0,270) e ou na interação entre tratamento e tempo de exposição (F=3,399; GL=1; P=0,102) (Gráfico 8).

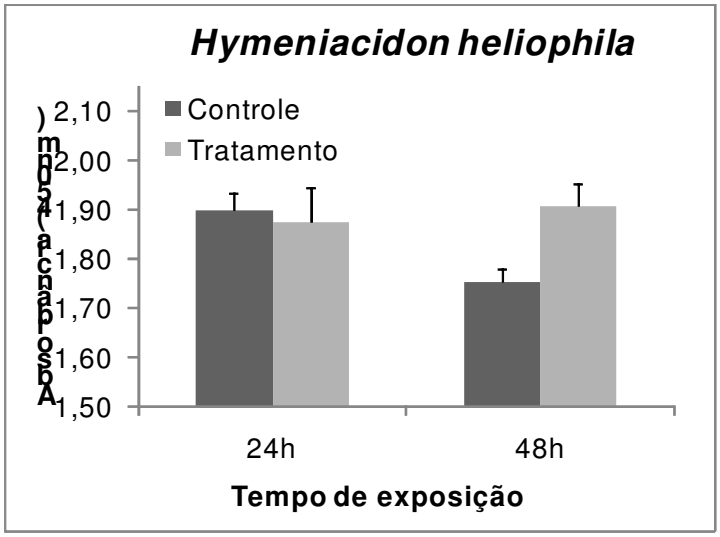

Gráfico 8 - Expressão da proteína P38 fosforilada (pP38) em *Hymeniacidon* heliophila (Parker, 1910) exposta a 30 µg/mL de LPS em 24 e 48 horas de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erro padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento.

4.1.2 Porifera expostos ao dodecil sulfato de sódio (SDS)

4.1.2.1 Espécie *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862

A esponja *Chondrilla* aff. *nucula* foi exposta ao SDS 0,25 mg/L por 24 e 48 horas. Porém, não foi realizada análise estatística porque o tamanho amostral foi baixo (N=2). Observou-se uma indicação de pequeno aumento na expressão de AIF-1 nas amostras expostas ao LPS em relação ao controle em 24 e 48 horas (Gráfico 9).

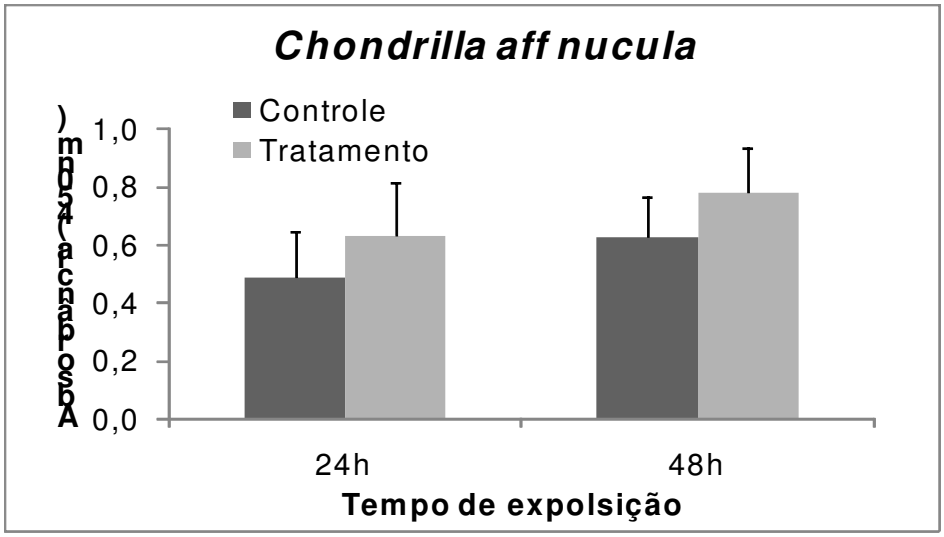

Gráfico 9 - Expressão da proteína AIF-1 em *Chondrilla* aff. *nucula* Schimidt, 1862 exposta a 0,25 mg/L de SDS em 24 e 48 horas de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erro padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento.

4.1.2.2 Espécie *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973)

A *esponja Polymastia janeirensis* foi exposta ao SDS 0,25 mg/L por 24 horas e 48 horas e a expressão de AIF-1 foi avaliada. As amostras apresentaram distribuição normal e as variâncias foram homogêneas. Na expressão de AIF-1 não houve diferença significativa entre tratamento e controle (F=0,506; GL=1; P=0,497), entre os tempos de exposição (F=0,641; GL=1; P=0,446) ou entre tratamento e tempo de exposição (F=7,199; GL=1; P=0,028) (Gráfico 10).

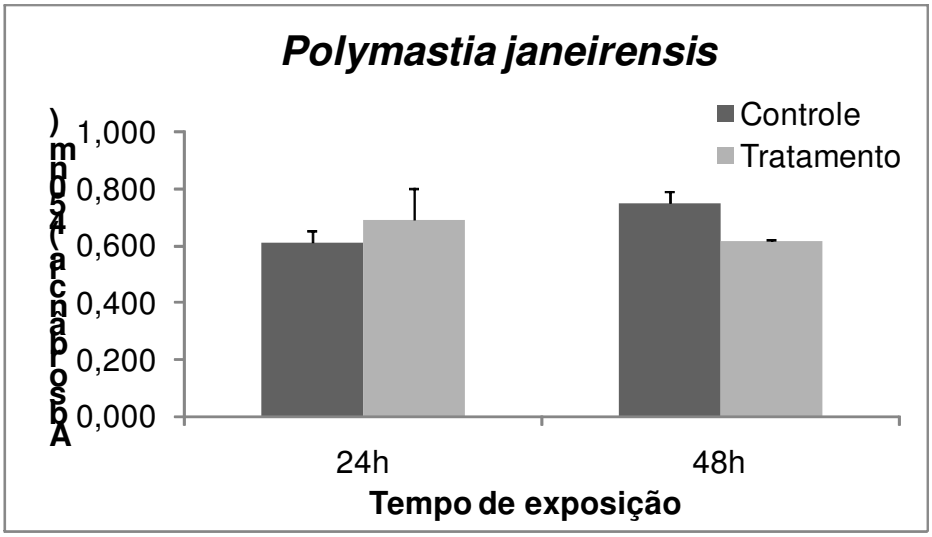

Gráfico 10 - Expressão da proteína AIF-1 em *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) exposta a 0,25 mg/L de SDS em 24 e 48 horas de exposição. As barras correspondem à absorção do ELISA a 450 nm e aos respectivos erro padrão; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento.

4.2 Resultados referentes a Mollusca

4.2.1 Ensaios de exposição dos mexilhões a poluentes

4.2.1.1 Exposição de *Perna perna* ao detergente não iônico, Triton X-100™

Os mexilhões *P. perna* foram exposto ao Triton X-100™ (0,10 g/L) e a mortalidade acompanhada na incubação por três horas, seis horas, 12 horas e 18 horas. As amostras foram testadas par a par, controle e tratamento. Não houve diferença significativa (X^2=1; GL=1; P=1) na mortalidade entre tratamento e controle na exposição por três horas. Houve diferença significativa na taxa de mortalidade entre o controle e os animais expostos ao detergente na incubação de seis horas (X^2=4; GL=1; P=0,046) 12 horas (X^2=11; GL=1; P=0,001), e 18 horas (X^2=20; GL=1; P< 0,001) (Gráfico 11).

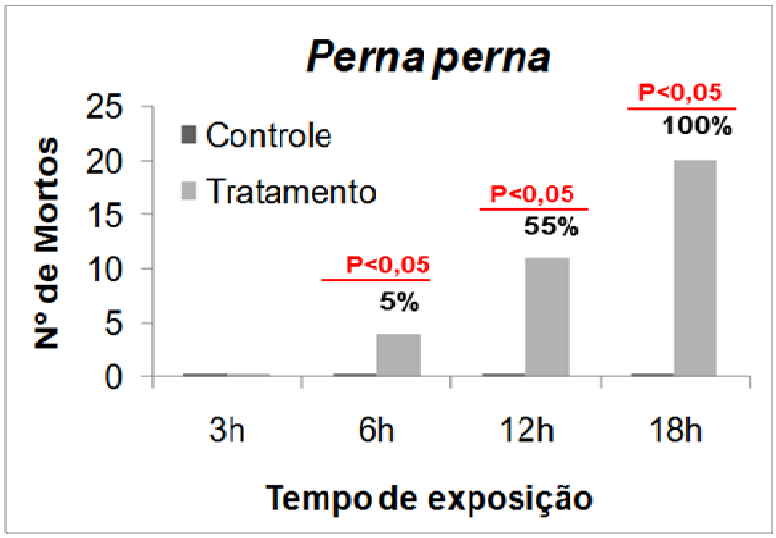

Gráfico 11 - Número de mexilhões mortos no ensaio de exposição ao Triton X-100™ em quatro tempos. O valor nas colunas é a porcentagem de mortalidade no ensaio. Os asteriscos destacam os resultados significativos; cinza escuro=controle, cinza claro=experimento. As barras de controle (3, 6, 12 e 18 horas) e Triton (3 horas) não são visualizadas porque nenhum animal morreu.

4.2.1.2 Exposição de *Perna perna* a esgoto doméstico *in natura*

No experimento de exposição dos mexilhões *P. perna* ao esgoto *in natura,* nenhum animal morreu. Por não haver diferença entre tratamento e controle, não realizamos análises estatísticas.

5 **DISCUSSÃO**

As respostas da biota aos poluentes são distribuídas no tempo; algumas ocorrendo imediatamente após o evento poluidor, e outras podendo levar de dias a meses para se manifestar (Gomes et al., 2000). Devido a essa questão, estudos que abordam a resposta de diferentes espécies a diversas concentrações e poluentes são importantes na formação de bases para o monitoramento ambiental. O estudo apresentado aborda a resposta de diferentes espécies expostas a diversos poluentes.

O presente estudo demonstrou que esponjas de várias espécies apresentam aumento na expressão da proteína AIF-1 quando em contato com poluentes, como altas concentrações de bactérias gram-negativas (condição simulada nos ensaios com LPS). Porém, o tempo necessário para observar a expressão de AIF-1 é espécie dependente. Este resultado é de extrema importância visto que a expressão desta molécula está associada às respostas inflamatórias (Kruse et al., 1999; Müller et al., 1999a) e ao reconhecimento do próprio/não próprio (Müller et al., 2002). No entanto, a presença de dispersantes (SDS) não afetou a expressão desta proteína (AIF-1), demonstrando que, além de haver diferenças específicas na expressão, esta varia de acordo com o poluente.

5.1 **Ensaios de exposição das esponjas a poluentes**

5.1.1 Porifera expostos à Lipopolissacarídeo de bactéria: Espécies *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula, Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis*

A exposição das espécies *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula* e *Polymastia janeirensis* a 20 µg/mL de LPS causou um aumento da expressão de AIF-1 comparado com o controle. Este resultado demonstra que estas espécies podem ser utilizadas como modelos para estudo da chegada de poluentes no meio através da expressão da resposta imune. Como já foi observado em estudos com *Suberites domuncula* e *Geodia cydonium*, estas esponjas apresentam a capacidade de

reconhecimento de bactérias gram-negativas e proteoglicanos (Thakur et al., 2005), respondendo com o aumento da síntese de lisozimas e da atividade endocítica (Perovic - Ottstadt et al., 2004).

Em *P. janeirensis*, após uma hora de exposição, viu-se um grande aumento na expressão de AIF-1 relativo ao controle, porém, após três horas esta expressão já não era mais visível. Já *D. robusta*, não apresentou um aumento grande na expressão de AIF-1 relativo ao controle, e, no caso de *A. fulva*, a expressão desta proteína só foi observada após 48 horas de exposição. Somente em *C.* aff. *nucula* foi observado um aumento na expressão de AIF-1 em relação ao controle em todos os tempos de incubação, podendo indicar que esta espécie seja mais sensível a chegada de poluentes. Sendo estes resultados preliminares, é importante ter cuidado ao avaliar estas respostas à presença de LPS. Contudo, mesmo com um número amostral reduzido, foram observadas diferenças no tempo de expressão de AIF-1 entre espécies. Com isso, antes de utilizar uma determinada espécie como modelo é sempre importante que se faça um teste *a priori* para avaliar o tempo de resposta da expressão das proteínas em questão, assim como um teste avaliando a resposta para cada poluente estudado.

5.1.2 Avaliação da expressão de AIF-1 e pP38 após a exposição ao LPS em *Hymeniacidon heliophila*

Resultados anteriores de exposição de *Hymeniacidon heliophila* ao LPS indicaram que a espécie provavelmente precisa de uma alta dose de LPS para produzir resposta para os marcadores utilizados (Sereno, 2010). Este padrão pode estar associado ao fato de *H. heliophila* ser encontrada em ambientes poluídos não sendo, então, muito sensível a este poluente (Turque et al., 2008). Devido a estes fatores optamos pela utilização de uma dosagem maior de LPS no tratamento com *Hymeniacidon heliophila* do que o utilizado com as outras espécies.

Houve diferença significativa na expressão de AIF-1 em relação ao controle nos ensaio de exposição por 30 minutos, uma, quatro, 24 e 48 horas, indicando que o LPS na concentração de 30 µg/mL foi eficiente para induzir a atividade de AIF-1. No entanto, só houve interação entre a expressão e o tempo de exposição nas exposições mais prolongadas (24 e 48 horas). Este resultado demonstra que há uma

necessidade de se investigar mais profundamente a relação entre expressão de AIF-1 e o tempo de exposição em *Hymeniacidon heliophila* e que, como observado na maioria das espécies estudadas (com exceção de *Dysidea robusta*), a expressão desta proteína depende fortemente do tempo de exposição ao LPS.

Não houve diferença significativa na expressão de pP38 entre controle e tratamento em nenhum dos ensaios de exposição ao LPS. Era esperado um aumento na expressão desta proteína nos tratamentos em relação ao controle, pois em estudos com *Suberites domuncula* foi observado um aumento da expressão de pP38 após contato com o mesmo LPS usado no presente estudo (Böhm et al., 2001; Muller et al., 2009). Uma das possibilidades é que a expressão ocorreu, porém em um período mais curto ou mais longo do que os tempos de exposição ao LPS utilizados nos ensaios. Uma outra explicação seria o fato de *H. heliophila* ser bem menos sensível à presença deste poluente, pois esta ocorre em lugares poluídos e, com isso, a concentração de LPS utilizada teria sido suficiente para induzir a expressão de AIF-1, mas não a de pP38. Isto seria bastante plausível uma vez que AIF-1 (Kruse et al., 1999) e pP38 (Böhm et al., 2000), não pertencem a mesma via imunológica e, por isso, podem apresentar respostas diferenciadas.

5.1.3 Avaliação da expressão de AIF-1 após a exposição ao dodecil sulfato de sódio (SDS) em *Chondrilla* aff. *nucula e Polymastia janeirensis*

A expressão de AIF-1 em *Chondrilla* aff. *nucula* foi registrada, e, apesar do número amostral pequeno, pôde-se observar um indício de aumento na expressão de AIF-1 em relação ao controle após 24 e 48 horas de incubação com SDS. Já na esponja *Polymastia janeirensis* não houve diferença significativa na expressão de AIF-1 entre o controle e o tratamento com SDS. Existe a possibilidade da concentração de SDS não ter sido alta o bastante para induzir uma resposta imune e, consequentemente, não foi observado um aumento na expressão de AIF-1. Outra possibilidade é que, como mencionado anteriormente, a expressão desta proteína foi ativada em um tempo não amostrado, ou ainda pode ser um artefato devido ao baixo tamanho amostral.

Mais uma vez, o resultado esperado era que houvesse uma diferença significativa na expressão de AIF-1, pois em *G. cydonium* exposta a 0,1 partes por

milhão (ppm) de SDS houve alteração no DNA, RNA e proteínas (Müller e Müller 1998), uma concentração bem inferior à utilizada no ensaio (que foi de 0,25 mg/L). Havendo alterações no DNA, RNA e proteínas era esperado que uma concentração mais alta que a utilizada por Muller e Muller (1998) levaria a ativação do sistema imune desses individuos e, consequentemente, à expressão de AIF-1. Porém, esta sensibilidade ao SDS pode ser espécie específica e as espécies utilizadas neste estudo não serem tão sensíveis como *G. cydonium*.

Vale ressaltar que os mecanismos efetores do SDS e do LPS são distintos e, portanto, não são comparáveis. Contudo, a ativação da resposta imune em esponjas pode também ser induzida por outros tipos de agentes poluentes distintos do LPS. Estudos com *Suberites domuncula*, *Geodia cydonium*, *Tethya lyncurium* (Linnaeus, 1767), atualmente aceita como *Tethya aurantium* (Pallas, 1766), e *Ephydatia muelleri* (Lieberkühn, 1856) registraram alteração na expressão de proteínas biomarcadoras e/ou dano no DNA após a exposição a vários poluentes como: polifosfatos inorgânicos (*Poly P*, do inglês *inorganic Polyphosphate*), benzoapireno, detergentes, compostos de tributilestanho (TBT, do inglês *Tributyltin compounds*), bifenil policlorados (PCBs, do inglês *Polychlorinated Biphenyl*) e metais pesados (Müller e Müller, 1998; Müller et al., 2000).

5.2 **Ensaios de exposição dos mexilhões a poluentes**

5.2.1 Exposição de *Perna perna* ao Triton X-100™

A poluição por surfactantes no mar é um fenômeno que precisa ser estudado mais profundamente, já que esses produtos são utilizados como dispersantes de óleos em derramamentos. Os surfactantes são pulverizados para facilitar a emulsão dos óleos na coluna de água (ITOPF, 20011), porém, pouco se sabe sobre o efeito desses dispersantes nos organismos marinhos.

No presente estudo, observou-se uma alta mortalidade dos mexilhões expostos ao Triton X-100™ na concentração utilizada de 0,10 g/L. Após apenas seis horas de exposição, foi observado um nível de 5% de mortalidade nos mexilhões. A porcentagem de mortalidade cresceu com o aumento do tempo de exposição ao

Triton X-100™ e após 18 horas de exposição todos os 20 indivíduos tratados morreram.

A grande mortalidade dos mexilhões no presente estudo pode ser justificada por uma possível redução da capacidade de filtração nos animais expostos ao detergente. Este fenômeno da filtração foi evidenciado por Ostroumov e Widdows (2006) para mexilhões das espécies *Mytillus edulis* e *Mytillus galloprovinciallis* na presença de surfactantes aniônico (SDS), não iônico (Triton X-100™) e catiônico (TDTMA, do inglês *Tetradecyltrimethyllammonium bromide*). Os mexilhões incubados com o detergente apresentaram fechamento das valvas. Este comportamento de fechamento das valvas foi identificado também em *M. edulis* na presença de zinco, cobre, chumbo, cádmio e TBTO (do inglês *Tributyltin oxide*) e TBTC (do inglês *Tributyltin chlorine*) (Kramer et al., 1989). Estes resultados demonstram a importância de se estudar o tempo de residência, não só do óleo durante um acidente de derramamento, como também o tempo de residência do dispersante que pode afetar negativamente a fauna filtradora local, como a de mexilhões.

5.2.2 Exposição de *Perna perna* ao esgoto doméstico *in natura*

A água é um dos recursos naturais mais utilizados pelo homem e a sua utilização traz conseqüências, como a geração de esgoto doméstico (Akaishi, 2007). No Brasil, o sistema de saneamento e tratamento de águas é um setor precário. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada em 2000, 14% da população urbana brasileira não tem acesso ao abastecimento público de água. Isso significa que 2,1% dos municípios não recebem abastecimento de água, e somente 49% da população é atendida com serviços de coleta de esgoto, e desse percentual, apenas cerca de 10% de todo esgoto produzido recebe algum tipo de tratamento (IBGE, 2000).

Um relatório desenvolvido pelo *Environment Canada*, em 2001, destaca cinco categorias de substâncias presentes no esgoto consideradas potenciais poluentes do ambiente aquático: as partículas sólidas suspensas na água, os patógenos (bactérias e vírus), o lixo orgânico, o excesso de nutrientes e a presença de

substâncias químicas, como produtos farmacêuticos, metais, amônia, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

O ensaio de exposição dos mexilhões *Perna perna* ao esgoto doméstico não causou mortalidade nos animais. O tamanho e a porcentagem de sólidos foram calculados, mas eles não influenciaram o resultado do ensaio, já que não houve diferença entre tratamento e controle.

O esgoto não causou mortalidade dos animais, mas outros parâmetros precisam ser analisados para garantir que os animais não foram afetados pelo contato com o esgoto. Os efeitos podem ter acontecido em nível molecular, como já foi observado em *M. edulis*, que tem resposta imunológica modulada na presença de esgoto, através do aumento da fagocitose e da produção de H_2O_2 e óxido nítrico (Akaishi, 2007). Com isso, faz-se necessária a execução de experimentos adicionais da expressão de proteínas relacionadas à resposta imune em estudos com mexilhões.

6 CONCLUSÕES

6.1 **Porifera**

- Expressão de AIF-1 em esponjas marinhas expostas ao lipopolissacarideo de *E. coli.*
- Esponjas *Aplysina fulva, Chondrilla* aff. *nucula, Dysidea robusta* e *Polymastia janeirensis* expostas a 20 µg/mL de LPS.
    - *Aplysina fulva* apresentou maior expressão de AIF-1 em relação ao controle após 48 horas de exposição.
    - *Chondrilla* aff. *nucula* apresentou maior expressão de AIF-1 em relação ao controle em três horas.
    - *Dysidea robusta* apresentou expressão de AIF-1 em relação ao controle em 30 minutos.
    - *Polymastia janeirensis* apresentou maior expressão de AIF-1 em comparação ao controle em uma hora.
- Exposição de *H. heliophila* ao 30 µg/mL LPS
    - O AIF-1 foi um eficiente biomarcador de estresse induzido pela exposição ao LPS. Houve diferença significativa na expressão de AIF-1 nos ensaios de exposição curta e longa.
    - Não houve expressão significativa de pP38 nos ensaios de exposição curta e longa.

- Expressão de AIF-1 em esponjas marinhas expostas ao 0,25 mg/L de SDS
- *Chondrilla* aff. *nucula*
    - Apresentou maior expressão de AIF-1 nas amostras expostas a SDS em relação ao controle em 24 e 48 horas.
- *Polymastia janeirensis*
    - Não houve diferença significativa entre a exposição ao SDS e o controle.

6.2 **Mollusca**

- Ensaios de exposição dos mexilhões a poluentes
- Exposição de *Perna perna* a 0,10g/L de Triton X-100™
    - Houve diferença significativa na mortalidade nos animais tratados com Triton X-100™ nos tempos seis, 12 e 18 horas. O tamanho dos animais e a porcentagem de sólidos não interferiram na resposta ao poluente.
- Exposição de *Perna perna* ao esgoto doméstico *in natura*
    - A exposição ao esgoto doméstico diluído na proporção de 1:50 não induziu mortalidade nos animais tratados. O tamanho dos animais e a porcentagem de sólidos não interferiram na resposta ao esgoto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott RT.1993. Kingdom of the seashell. American malacologists, 256 p.

Agell G, Uriz MJ, Cebrian E, Martí R. 2001. Does stress protein induction by copper modify natural toxicity in sponges? Environmental Toxicology and Chemistry, 20(11): 2588-2593.

Alcolado P, Herrera A. 1987. Efectos de la contaminación sobre las comunidades de esponjas en el litoral de La Habana, Cuba. Reporte de Investigacion del Instituto de Oceanologia, Academia de Ciencias, 68: 1-23.

Amaral ACZ, Migotto AE, Turra A, Schaeffer–Novelly Y. 2010. Araçá: biodiversity, impacts and threats. Biota Neotropical, 10(1): 219-264.

Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, Mugnai R, Baptista DF. 2006. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciência e Saúde Coletiva, 12: 61-72.

Akaishi FM. 2007. Avaliação dos efeitos tóxicos de esgoto doméstico tratado e não-tratado em bivalve marinho *Mytilus edulis.* Universidade Federal do Paraná, Brasil. PhD, Tese, Universidade Federal do Paraná. 133 p.

Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB. 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. U.S. Environmental Protection Agency, Second Edition. EPA 841-B-99-002.

Bebby A. 2001. What do sentinels stand for? Environmmental Pollution, 112: 285-298.

Bergquist PR. 1978. Sponges. University of California press, Berkeley and Los Angeles, 268 p.

Berlinck RGS, Hajdu E, Rocha RM, Oliveira JHHL, Hernández ILC, Seleghim MHR, Granato AC, Almeida EVR, Nuñez CV, Muricy G, Peixinho S, Pessoa C, Moraes MO, Cavalcanti BC, Nascimento GGF, Thiemann O, Silva M, Souza AO, Silva Cl, Minarini PRR. 2004. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. Journal of Natural Products, 67: 510-522.

Berthet B, Mouneyrac C, Pérez T, Amiard-Triuqet C. 2005. Metallothionein concentration in sponges *Spogia officialis* as a bioarker of metal contamination. Comparative biochemistry and physiology, 144(C): 306-313.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.

Blumbach B, Diehl-Seifert B, Seack J, Steffen R, Muller IM, Muller WEG. 1999. Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. Immunogenetics, 49: 751-763.

Böhm M, Schröder HC, Müller IM, Müller WEG, Gamulin V. 2000. The mitogen–activated protein kinase P38 pathway is conserved in metazoans: cloning and activation of P38 the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula.* Biology of the Cell, 92: 95-104.

Böhm M, Hentschel U, Friedrich AB, Fieser L, Steffen R, Gamulin V, Müller IM, Müller WEG. 2001. Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. Marine Biology, 139: 1037-1045.

Brusca RC, Brusca GJ. 2003. Invertebrates. Segunda edição. Editora Sinauer associates. 922 p.

Burlando B, Berti E, Viarengo A. 2006. Effects of seawater pollutants on protein tyrosine phosphorylation in mussel tissues. Aquatic Toxicology, 78S: S79-S85.

Buss DF, Oliveira RB, Baptista DF. 2008. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. *Oecologia Brasiliensis* 12(3): 339-345.

Bustos-Baez S, Frid C. 2003. Using indicator species to assess the state of macrobenthic communities. Hydrobiologia 496, 299-309.

Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquet C, Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. The science of the Total Environment, 247: 295-311.

Cantillo AY. 1998. Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with worldwide Mussel Watch studies. Marine Pollution Bulletin, 36(9): 712-717.

Carmo TMS, Costa MB, Siqueira HP. 1984. Determinação do valor nutritivoda carne de mexilhões, *Perna perna* (Mollusca:Bivalvia). Estudos sobre o teor de proteínas, lípides, glicogênio e água. Resumos. *In:* Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 36: 750.

Cebrian E, Martí R, Uriz MJ, Turon X. 2003. Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: metal accumulation and biological responses. Marine Pollution Bulletin, 46: 1273-1284.

Cebrian E, Uriz MJ. 2007. Contrasting effects of heavy metals and hydrocarbons on larval settlement and juvenile survival in sponges. Aquatic Toxicology, 81: 137-143.

Châtel A, Hamer V, Talarmin H, Dorange G, Schröder HC, Müller WEG. 2010. Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution. Aquatic Toxicology, 96: 247-255.

CONAMA. 1986. Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 001 de 23 de janeiro de 1986.

Curtius AJ, Seibert EL, Fiedler HD, Ferreira JF, Vieira PHF. 2003. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividade de maricultura resultados parciais de um estudo de caso realizado na ilha de Santa Catarina, Brasil. Química nova, 26(1): 44-52.

Dauer DM, Ranasinghe JA, Weisberg SB. 2000. Relationships between benthic community condition, water quality, sediment quality,nutrient loads, and land use patterns in Cheasapeake Bay. Estuaries 23, 80-96.

Dauvin JC. 1993. Le benthos: témoin des variations de l'environnement. Océanis 19:25-53.

Dauvin JC, Ruelet T, Desroy N, Janson AJ. 2007. The ecological quality status of the Bay of Seine and Seine estuary: Use of biotic indices. Marine Pollution Bulletin, 55: 241-257.

Dizer H, Hagendorf U. 1991. Microbial contamination as an indicator of sewer leakage. Water Research, 27:7: 791-796.

Dornelles PR, Lailson-Brito J, Fernandez MAS, Vidal LG, Barbosa LA, Azevedo AF, Fragoso ABL, Torres JPM, Malm O. 2008. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. Environmental Pollution, 156: 1268-1276.

Environment Canada. 2001. The state of municipal wastewater effluents in Canada. Indicators and assessment office, Environmental Conservation Service, 67 p.

Farrington J W, Goldberg ED, Risebrough RW, Martin JH, Vaughan TB. 1983. U.S. "Mussel Watch" 1976-1978: an overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon, and artificial radionuclide data. Environmental Science and Technology, 17: 490-496.

Fent K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology, 205: 223-240.

Fernandes FC, Souza RCL, Junqueira AOR, Rapagnã LC, Ramos AB. 2008. Distribuição mundial e o impacto de sua introdução no Brasil. *In*: Resgalla JRC, Weber LI, Conceição MB, editores. O mexilhão *Perna perna* (L.): Biologia, Ecologia e Aplicações. Rio de Janeiro, Interciência, 324p.

Ferreira JM, Magalhães ARM. 2003. Cultivo de Mexilhões. [Internet] Site: www.cca.ufsc.br.

Ferreira JM. 2006. Coletores de sementes de mexilhão. A opção do mitilicultor catarinense para retomar o crescimento da produção. Panorama da Aqüicultura, julho/agosto, 43-48.

Fischer H. 1986. Influence of temperature, salinity, and oxygen on the cadmium balance of mussels *Mytilus edulis.* Marine Ecology Progress Series, 32: 265–278.

Francioni E, Wagener ALR, Scofield AL, Depledge MH, Cavalier B. 2007. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) exposure and effects. Marine Pollution Bulletin, 54: 329-338.

Friedrich AB, Merkert H, Fendert T, Hacker J, Proksch P, Hentschel U. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Marine Biology, 134: 461-470.

Fu W, Wu Y, Sun L, Zhang. 2007. Efficient bioremediation of Total Organic Carbon (TOC) in integrated aquaculture system by marine sponge *Hymeniacidon perleve*. Biotechnology and Bioengineering, 97: 6.

Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. 1997. Interaction of MAP Kinase with MAP Kinase: Its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP Kinase. The EMBO Journal. 16(8): 1901-1908.

Gaitanaki C, Kefaloyianni E, Marmari A, Beis I. 2004. Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) Molecular and Cellular Biochemistry, 260: 119-127.

Giarratano E, Duarte CA, Amin AO. 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal Waters of the Beagle Channel. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73: 270-279.

Gomes AS, Palma JJC, Silva CG. 2000. Causas e conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. Brazilian Journal of Geophysics,18: 3.

Goulart M, Callisto M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Revista da Falculdade Pará de Minas gerais, 2: 1.

Hayry P, Von Willebrand E, Parthenais E, Nemlander A, Soots A, Lautenschlager A, Alfoldy P, Renkonen R. 1984. The inflammatory mechanism in allograft rejection. Immunology Review, 77: 85-142.

Henriques MB. 2004. Resistência do Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da Baixada Santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Brasil. PhD. Tese, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". 113 p.

Hooper JNA, van Soest, RWM. 2002. Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 1706 p.

ITOPF. 2011. The international tanker owners pollution federation limited. [Internet] Site: www.itopf.com/spill-response/clean-up-and-response/dispersants/ Consultado em 25 de maio de 2011.

IBGE. 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. [Internet] Site: www.ibge.gov.br.

Keller GM. 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. Current Opinion in Cell Biolology, 7: 862-869. *In*: Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. Custódio MR, Prokic I, Steffen R, Koziol C, Borojevic R, Brümmer F, Nickel M, Müller WEG, editores. 1998. Mechanisms of Ageing and Development, 105: 45-59.

Klautau M, Russo CAM, Lazoski C, Boury-Esnault N, Thorpe JR, Sole-Cava AM. 1999. Does Cosmopolitanism Result from Overconservative Systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. Evolution, 53(5): 1414-1422.

Kramer K, Jenner H, Zwart D. 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. Hydrobiologia, 188/189: 433-443.

Kruse M, Steffen R, Batel R, Müller IM, Müller WEG. 1999. Differential expression of Allograft Inflammatory Factor -1 and of Glutathione Peroxidase during auto - and allograft response in marine sponges. Journal of Cell Science, 112: 4305-4313.

Larsen OS, Riisgård. HU. 1994. The Sponge Pump. Journal of Theorethical Biology, 168: 53-63.

Lauenstein GG, Daskalakis KD. 1998. U.S. Long-term coastal contaminant temporal trends determined from mollusk Monitoring Programs, 1965-1993. Marine Pollution Bulletin, 37(I-2): 6-13.

Lerne C, Mothes B, Carraro JL. 2005. Novos registros a ampliação de limites meridionais de distribuição de poriferos (Porifera, Demospongiae) no Atlântico sudoeste. Revista Brasileira de Zoologia, 22(3): 596-612.

Magalhães ARM. 1985. Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Molusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Dissertação. Universidade de São Paulo. 117 p.

Marchalonis JJ, Schluter SF. 1994. Development of immune system. Annals of the New York Academy of Sciences, 712: 1-12.

Marques HLA. 1998. Criação comercial de mexilhões. Editora Nobel. 108 p.

Mason DW, Morris PJ. 1986. Effectors' mechanisms in allograft rejection. Annual Review of Immunology, 4: 119-145.

Medzhitov R, Janeway C. 2000. Innate Immunity. New England Journal of Medicine, 343: 338-344.

Milanese M, Chelossi E, Manconi R, Sarà A, Sidri M, Pronzato R. 2003. The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. Biomolecular Engineering, 20: 363-368.

Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR, 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutation Research, 552: 247-268.

Müller WEG, editor. 2003. Marine Molecular Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin. 258 p.

Müller WEG, Müller IM. 1998. Sponge cells and tissue as biological monitors of aquatic pollution. Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice, Capítulo 6.

Müller WEG, Blumbach B, Müller IM. 1999a Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest Metazoan Phylum (Porifera) and those in vertebrates. Transplantation, 68: 1215-1227.

Müller WEG, Kruse M, Blumbach B, A. Skorokhod, Müller IM. 1999b. Gene structure and function of tyrosine kinases in the marine sponge *Geodia Cydonium:* autapomorphic characters of Metazoa. Gene, 238: 179-193.

Müller WEG, Koziol C, Wiens M, Schröder HC. 2000. Stress response in marine sponges: genes and molecules involved and their use as biomarkers. *In*: Cell and molecular responses to stress. Storey KB, Storey JM, editores. Environmental Stressors and Gene Responses, Elsevier, Amsterdam. Pp. 193–208. Capítulo 14.

Müller WEG, Steffen R, Lorenz B, Batel R, Kruse M, Krasko A, Müller IM, Schröder HC. 2001. Suppression of allograft rejection in the sponge *Suberites domuncula* by FK506 and expression of genes encoding FK506-binding proteins in allografts. Journal of Experimental Biology, 204: 2129-2207.

Müller WEG, Krasko A, Skorokhod A, Bünz C, Grebenjuk VA, Steffen R, Batel R, Schröder HC. 2002. Histocompatibility reaction in tissue and cells of the marine sponge *Suberites domuncula in vitro* and *in vivo*: central role of the allograft inflammatory factor-1. Immunogenetics, 54: 48-58.

Müller WEG, Müller IM, 2003. Origin of the metazoan immune system: Identification of the molecules and their functions in sponges. Integrative and Comparative. Biology, 43: 281-292.

Müller WEG, Schwertner H, Müller IM. 2004. Porifera a reference phylum for evolution and bioprospecting: the power of marine genomics. The Keio Journal of Medicine, 53(3): 159-165.

Müller WEG, Custódio MR, Wiens M, Zilberberg C, Châtel A, Müller IM, Schröder HC. 2009. Effect of bacterial infection on stem cell pattern in Porifera. *In*: Stem cell systems in invertebrates. Rinkevich B, Matranga V, editores. Springer Science & Business Media. Pp. 309-336.

Muricy G. 1989. Sponge as pollution-biomonitors at Arraial do Cabo, Southeasthern Brazil. Revista Brasileira de Biologia, 49: 347-354.

Muricy G. 1991. Structure des peuplements de spongiaires autour de l'egout de Cortiou (Marseille, France). Vie et Milieu, 41(4): 205-221.

Muricy G, Hajdu E, Custódio M, Klautau M, Russo C, Peixinho S. 1991. Sponge distribution at Arraial do Cabo, SE, Brazil. Proceedings of the VII Symposium on Coastal and oceanic Management: Coastal Zone'91. ASCE Publications, 1183-1196.

Muricy G, Hajdu E, Araujo FV, Hagler A. 1993. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). Scientia Marina. 57(4): 427-432.

Muricy G, Silva OC. 1999. Esponjas marinhas do Rio de Janeiro: Um recurso renovável inexplorado, Oecologia Brasiliensis, 7: 155-178.

Muricy G, Hajdu E. 2006. Porifera Brasilis: Guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. Série Livros 17, Museu Nacional. 104 p.

Muriy G, Esteves EL, Moraes F, Santos JP, Silva SM, Klautau M, Lana E. 2008. Biodiversidade marinha na Bacia Potiguar: Porifera. Série Livros 29, Museu Nacional. 156 p.

Nordsieck F. 1969. Die Europainsche Mureusmuscheln. Stuttgart, Gutav Fischer, 256p.

O'Connor TP. 1998. Mussel Watch Results from 1986 to 1996. Marine Pollution Bulletin, 37(1- 2): 14-19.

Ostroumov AS, Windows J. 2006. Inhibition of mussel suspension feeding by surfactants of three classes. Hydrobiologia, 556: 381-386.

Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. 2004. Medical Immunology, 10a. Edição, Appeton & Lange, 814p.

Pearson TH, Rosenberg R. 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. Oceanography and Marine Biology: an Annual Review, 16: 229-311.

Perez T, Garrabou J, Sartorreto S, Harmelin JG, Francour P, Vacelet. 2000. Mortalité massive d'invetébrés marins: un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale. C R Acad. Sci. Paris, 323: 853-865.

Pereira CS. 2003. A cultura de mexilhões na baía de guanabara e suas implicações para a saúde pública - Contexto político-social e microbiológico. Pós - Graduação em Saúde Pública, Brasil. PhD. Tese. Fundação Oswaldo Cruz. 177p.

Perez T, Wafo E, Fourt M, Vacelet J. 2003. Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: concentration and fate of 24 congeners. Enviromental science and technology, 37(10): 2152-2158.

Perovic- Ottstadt S, Adell T, Proksch P, Wiens M, Korzhev M, Gamulin V, Müller IM, Müller WEG, 2004. A (1? 3)-ß-D-Glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula:* mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression. European Journal of Biochemistry, 271: 1924-1937.

Ramos, PAG. 2004. Advanced mathematical modeling for outfall plume tracking and management using autonomous underwater vehicles based systems. Faculdade de engenharia do Porto, Portugal. PhD. Tese. Universidade do Porto. 271 p.

Ravera O, Riccardi N. 1997. Biological monitoring with organisms accumulator of pollutants. Marine Chemistry, 58: 313-318.

Reddy ML, Dierauf LA, Gulland FMD. 2001. Marine mammals as sentinels of the ocean health. *In:* Dierauf, L.A., Gulland, M.D. (Eds.), Handbook of Marine Mammal Medicine. CRC Press, Boca Raton, 313p.

Reiswig HM. 1971. *In situ* pumping activities of tropical Demospongiae. Marine Biology, 9: 38-50.

Rios EC. 1994. Seashells of Brazil. Editora FURG, segunda edição, 492 p.

Roméo M, Hoarau P, Garello G, Gnassia-Barelli M, Girard JP. 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. Environmental Pollution, 369-378.

Ross P, Stewart RD, Adisson R, van Loveren H, Vos J, Oterhaus A. 1996. Contaminat induced immunotoxicity in harbour seal: at risk? Toxicology, 122: 157-169.

Ross, P.S., 2000. Marine mammals as sentinels in ecological risk assessment. Human and Ecological Risk Assessment, 6: 29-46.

Rupert EE, Barnes RD, 1996. Zoologia dos invertebrados. Sexta Edição, Rocca, 1029 p.

Santos R F. 2007. Vulnerabilidade ambiental. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio ambiente. Brasil, volume 991. 192p.

Sara M, Vacelet J. 1973. Ecologie des Démosponges. *In*: Traité de Zoologie, Grassé PP, editor. V. 3 (Part I): 463-575.

Sarkar A, Ray D, Shrivastava NA, Sarker S. 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology, 15(4): 333-340.

Seed R. 1976. Ecology. *In:* Marine Mussel: their ecology and physiology. Bayne BL, editor. Cambridge University Press. Pp. 13-65.

Seleghim MHR, Lira SP, Kossuga MH, Batista T, Berlinck RGS, Hajdu E, Muricy G, Rocha RM, Nascimento GGF, Silva M, Pimenta EF, Thiemann, Oliva G, Cavalcanti BC, Pessoa C, Moraes MO, Galleti FCS, Silva CL, Souza AO, Peixinho S. 2007. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibition activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(3): 287-318.

Sennet SH, Wright AE, Pomponi SA, Armstrong JE, Willoughby R, Bingham BL. 1990. Cellular localization and ecological role of secondary metabolites from the sponge *Hymeniacidon heliophila*. International Society Chemical Ecology Annual Meeting, 8-15.

Sereno D. 2010. Utilização de esponjas marinhas e mexilhões como bioindicadores de poluição Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil. Monografia, Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 58 p.

Schröder HC, Krasko A, Batel R, Skorokhod A, Pahler S, Kruse M, Muller IM, Muller WEG, 2000. Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. FASEB Journal, 14: 2022-2031.

Schröder HC, Efremova SM, Margulis BA, Guzhova IV, Itskovich VB, Müller WEG. 2006. Stress response in Baikalian sponges exposed to pollutants. Hydrobiologia, 568(S): 277–287.

Shahidul Islam M, Tanaka M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Marine Pollution Bulletin, 48: 624-649.

Silva DBC, 2010. Potencial das esponjas marinhas (Filo Porifera) como biomonitoras de poluição no litoral do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. PhD. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Stix H, Stix M, Abott RT. 1984. The shell: gift of the sea. New York: Abrams, 163p.

Taban IC, Bechmann RK, Torgrimsen S, Baussant T, Steinar S. 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using Comet Assay. Marine Environmental Research, 58: 701-705.

Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology and Biotechnological Potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(2): 295-347.

Thakur NL, Perovic-Ottstadt S, Batel R, Korzhev M, Diehl-Seifert B, Müller IM, Müller WEG, 2005. Inate imune defense of the sponge *Suberites domuncula* against Gram–positive bacteria: induction of Lysozime and Adaptin. Marine Biology, 146: 271-282.

Trevisan R. 2008. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinense. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil. Monografia, Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. 70 p.

Turque AS, Cardoso AM, Silveira CB, Vieira RP, Freitas FAD, Albano RM, Gonzalez AM, Paranhos R, Muricy G, Martins OB. 2008. Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. Marine Biology, 155: 135-146.

Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. 1995. Cloning and characterization of Allograft Inflammatory Factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allograft with chronic rejection, Journal of Clinical Investigation, 95: 2954-2962.

Underwood AJ. 1997. Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge, 504 p.

Van Loveren H, Ross PS, Osterhaus ADME, Vos JG. 2000. Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbour seals. Toxicology Letters, 112: 319-324.

Van Soest RWM, Boury-Esnault N, Hooper JNA, Rützler K, de Voogd NJ, Alvarez de Glasby B, Hajdu E, Pisera AB, Manconi R, Schoenberg C, Janussen D, Tabachnick KR, Klautau M, Picton B, Kelly M. 2011. World Porifera database. [Internet] Site: www.marinespecies.org/porifera. Acessado em 01de março de 2001.

Viarengo A, Burlando B, Cavaleto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprincialis.* The American Journal of Physiology, 277: 1612-1619.

Vos JG. 1977. Immune suppression as related to toxicology. CRC Critical Reviews in Toxicology, 5: 67-101.

Vogel S, 1977. Current-induced flow through living sponges in Nature. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A, 74: 069, 2071.

Vukmirovic M, Bihari N, Zahn RK, Müller WEG, Batel R. 1994. DNA damage in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of environmental contamination. Marine Ecology Progress Series, 109: 165-171.

Wells RS, Rhinehart HL, Hansen LJ, Sweeney JC, Townsend FI, Stone R, Casper DR, Scott MD, Hohn AA, Rowles TK. 2004. Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: developing a health monitoring system. EcoHealth, 1:246-254.

Wells RS, Rhinehart HL, Hansen LJ, Sweeney JC, Townsend FI, Stone R, Casper DR, Scott MD, Hohn AA, Rowles TK. 2004. Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: developing a health monitoring system. EcoHealth, 1:246-254.

Whitfield J. 2001. Vital Signs. Nature, 411(28): 989-990.

WHO, World Health Organization. 2001. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Environmental health criteria. Geneva: World Health Organization, 222: 238.

Wiens M, Koziol, Hassanein HMA, Batel R, Scröder HC, Müller WEG. 1998. Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2',3',4,4',5-pentachloro - byphenil) marine sponge *Geodia cydonium*: novel biomarkers for Polychlorinated Biphenyls. Marine Ecology Progress Series, 165: 247-257.

Wiens M, Kuusksalu A, Kelve M, Muller WEG. 1999. Origin of the interferon-inducible (2 '-5') oligoadenylate synthetases: cloning of the (2'-5')oligoadenylate synthetase from the marine sponge *Geodia cydonium*. FEBS Letters. 462: 12-18.

Wiens M, Korzhev M, Krasko A, Thakur NL, Perovic- Ottstadt S, Breter HJ, Ushijima H, Diehl-Seifert B, Müller IM, Müller WEG. 2005. Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88 - dependent signaling pathway. The Journal of Biological Chemistry, 280: 1-11.

Wiens M, Korzhev M, Perovic´-Ottstadt S, Luthringer B, Brandt D, Klein S, Müller WEG, 2007. Toll-Like Receptors are part of the innate immune defense system of sponges (Demospongiae: Porifera) Molecular Biology and Evolution, 24(3): 792-804.

Wilkinson CR. 1978a. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. Marine Biology, 49: 161-167.

Wilkinson CR. 1978b. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. Marine Biology, 49: 169-176.

Wimmer W, Perovic S, Kruse M, Schroder HC, Krasko A, Batel R, Muller WEG. 1999. Origin of the integrin-mediated signal transduction. Functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. European Journal of Biochemistry, 260: 156-165.

Wulff J. 2001. Assessing and monitoring Coral Reef Sponges: Why and How? Bulletin of Marine Science, 69 (2): 831-846.

Zilberberg C, Sereno D, Lima G, Custódio MR, Lôbo-Hajdu G. 2011. Effect of mussel's gender and size on a stress response biomarker. Water, Air, and Soil Pollution, 217(1-4): 317-320.