

SIBELLE CHRISTINE GLASER JAKOBI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM
ÁGUA (FSA) E DO TRIBUTILESTANHO (TBT) SOBRE O MECANISMO DE
RESISTÊNCIA A MULTIXENOBIÓTICOS (MXR) NO MEXILHÃO *PERNA*
*PERNA***

**Monografia apresentada ao Departamento de
Biologia Celular para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Ciro A. de O. Ribeiro

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Pessatti
(UNIVALI)**

CURITIBA

2004

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA
(FSA) E DO TRIBUTILESTANHO (TBT) SOBRE O MECANISMO DE
RESISTÊNCIA A MULTIXENOBIÓTICOS (MXR) NO MEXILHÃO *PERNA PERNA***

ORIENTADOR: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Professor do Departamento de Biologia Celular – UFPR

CO-ORIENTADOR: Dr. Marcos Luiz Pessatti
Coordenador do curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia –
UNIVALI

BANCA:

Mst. Marco Antônio Ferreira Randi
Professor do Departamento de Biologia Celular – UFPR

Dra. Lúcia Elvira Álvares
Professora do Departamento de Biologia Celular – UFPR

“SOMOS MAIS SENSÍVEIS AO QUE É FEITO A CULTURA DO QUE A NATUREZA.”

PLUTARCO, 100 DC

AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas que foram essenciais para que pudesse realizar esta monografia...

Primeiro, devo agradecer ao meu orientador, Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, que durante 4 anos me ensinou tudo o que eu sei e o que é mais importante em uma faculdade, me ensinou a enfrentar os desafios de frente e o que significa ser realmente uma pesquisadora.

Essencial foi também meu co-orientador, dr. marcos pessatti que mesmo sem me conhecer abriu todas as portas para que este trabalho pudesse ser realizado na UNIVALI.

Agradeço a todas as pessoas que trabalharam comigo no laboratório, tanto do Laboratório de Toxicologia Celular (Fabíula Valdez, Fabíula Akaishi, João, Inês, Francisco, entre muitos outros) da UFPR quanto do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (especialmente a Paula, Larissa, Felipe e Tiago) da UNIVALI, que muito me ensinaram, ajudaram e que também participaram de momentos divertidos e inesquecíveis.

Agradeço também a todos os professores que permitiram que eu trabalhasse em seus laboratórios durante o tempo em que estive trabalhando na UNIVALI.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, que me cederam horários para que eu pudesse fazer as análises de varredura.

Outras pessoas participaram de forma indireta mas muito especial, como meu pai e minha mãe, que me deram suporte financeiro nesta empreitada, meu namorado, Igor Xavier, que compreendeu que tinha que ficar longe e que me apoiou todo o tempo, além dos meus tios Hans, que me cedeu o apartamento onde fiquei, e Rolanda, assim como o Chico, a Ana e a Milena, que me ajudaram nos momentos que mais precisei.

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO	II
PREAMBULO	III
AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE GRAFICOS.....	VI
LISTA DE PRANCHAS	VI
LISTA DE ABREVIações.....	VII
RESUMO	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.2 OBJETIVOS	11
1.2.1 OBJETIVO GERAL	11
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. MATERIAL E METODOS	12
2.1 ANIMAIS	12
2.2.OBTENÇÃO DO FSA	13
2.3 BIOENSAIOS	14
2.4 ENSAIO DO TRANSPORTE (EFLUXO) DE RODAMINA B PELO MECANISMO MXR	15
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	16
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	31
6. REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - MEXILHÕES PERNA PERNA.....	9
- FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	13
- FIGURA 3 - SEÇÃO BRANQUIAL EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA	17

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - ACÚMULO DE RODAMINA B (MMOLES.L-1) EM BRÂNQUIAS EXPOSTAS AO FSA.....	18
- GRÁFICO 2 - ACÚMULO DE RODAMINA B (MMOLES.L-1) EM BRÂNQUIAS EXPOSTAS AO TBT.....	19
- GRÁFICO 3 - ACÚMULO DE RODAMINA B (MMOLES.L-1) EM BRÂNQUIAS EXPOSTAS AO FSA 33% E ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TBT	20
- GRÁFICO 4 - ACÚMULO DE RODAMINA B (MMOLES.L-1) EM BRÂNQUIAS EXPOSTAS AO TBT 25 NG/L E ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSA	21

LISTA DE PRANCHAS

- PRANCHA 1 - ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS DO MEXILHÃO PERNA PERNA.....	23
- PRANCHA 2 - ULTRAESTRUTURA DA BRÂNQUIA DO MEXILHÃO PERNA PERNA EXPOSTO Á TBT 25 NG/L E FSA VARIANDO ENTRE 15 E 100%.....	24
- PRANCHA 3 - ULTRAESTRUTURA DA BRÂNQUIA DO MEXILHÃO PERNA PERNA EXPOSTO Á FSA 33% E TBT VARIANDO ENTRE 25 E 500 NG/L.	25

LISTA DE ABREVIACOES

TBT - Tributilestanho

DBT – Dibutilestanho

FSA - Fração Solúvel do Petróleo em gua

PAH – Hidrocarboneto Policiclico Aromático

MXR – Mecanismo de Resistência a Multixenobiticos

Pgp – Glicoproteína-P

MDR – Mecanismo de Resistência a Multidrogas

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

GTP – Guanosina Tri-Fosfato

TBS – *Tris buffer saline*

mRNA – RNA mensageiro

BaP – Benzo(a)pireno

P450 – sistema citocromo P450

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos têm sido utilizados ao longo da história da humanidade como a forma mais apropriada para o descarte de resíduos provenientes da atividade antrópica. Entretanto, estes têm uma capacidade limitada de receber tais resíduos. Exemplos deste resíduos são o TBT e o FSA, contaminantes comuns em regiões portuária onde o mexilhão *Perna perna* pode ocorrer. Estudar respostas do organismo capazes de diagnosticar a contaminação ambiental antes que esta atinja níveis estruturais altos do mesmo organismo e assim comprometer a sua sobrevivência é um dos principais desafios da ecotoxicologia atualmente. Neste trabalho, utilizamos a taxa de efluxo da rodamina B pelo mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) para avaliar o efeito subletal do FSA e TBT. Para tanto, contaminamos os mexilhões separadamente com concentrações encontradas em ambientes naturais de TBT (25, 55, 100, 300 e 500 ng/L) e de FSA (15, 25, 33, 50%) além, de outras duas (75 e 100%) para se verificar o efeito deste último contaminante em casos extremos. Foram definidas entre estas concentrações uma dose de cada contaminante (25ng/L de TBT e 33% de FSA) para se analisar o efeito destes contaminantes de forma conjunta, mantendo-se fixa um deles e variando o outro nas concentrações já citadas. Além da avaliação da taxa de efluxo foi realizado também a avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos organismos expostos aos dois compostos concomitantemente.

Entre os resultados encontrados, percebemos que as concentrações de FSA encontradas no ambiente se mantiveram próximas ao controle, sem diferença significativa, demonstrando uma ótima resposta do mecanismo de detoxificação celular como um todo, não sendo a Pgp sobrecarregada. As concentrações de 75 e 100% apresentaram uma forte inibição do mecanismo, podendo esta ser uma tendência do contaminante. Já nas concentrações de TBT a única dose que diferiu foi a de 100 ng/l, apresentando uma menor tendência a indução do mecanismo que as demais. Quando se expôs os organismos aos dois contaminantes observou-se perfis distintos, mantendo-se o FSA fixo a resposta era de uma leve inibição estando os níveis próximos ao controle. Com o TBT fixo o perfil encontrado foi parecido com o encontrado para o TBT isolado. Estas diferentes respostas podem ser devido ao TBT agir como um sensibilizador, fazendo com que o FSA tenha seu efeito pleno sobre o mecanismo. Para que isto ocorra devem estar envolvidos outros mecanismos de detoxificação, provavelmente o sistema P450, o qual é inibido pelo TBT e responsável pela conversão do FSA em compostos efluxados pela Pgp. Devem ser feitos mais estudos para se comprovarem estas hipóteses, principalmente envolvendo o mecanismo e o sistema P450 com estes contaminantes.

Nas análises de MEV, observou-se duas alterações na disposição dos cílios, sendo uma delas restrita aos grupos em que o FSA manteve-se fixo. Nesta alteração, os cílios formavam grupamentos circulares. Na outra alteração, os cílios se entrelaçavam, formando pontes entre os filamentos adjacentes. Ambas alterações alteram o fluxo de água no interior da brânquia, dificultando a alimentação e a troca de gases dos organismos afetados.

1. INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os ecossistemas aquáticos têm sido utilizados ao longo da história da humanidade como a forma mais apropriada para o descarte de resíduos provenientes da atividade antrópica. Até recentemente acreditava-se que esses ecossistemas apresentavam uma capacidade infinita de reter tais resíduos; sendo assim, a solução para a presença de contaminantes seria a simples diluição dos mesmos nestes ambientes naturais.

Além de vários destes compostos encontrados nestes resíduos apresentarem potencial tóxico, eles podem ainda ser modificados através de reações bióticas, abióticas, e/ou biotransformados no interior do organismo, o que pode acarretar em um aumento na sua biodisponibilidade e conseqüentemente na sua toxicidade, modificações que também podem favorecer sua dispersão (LINDQUIST, 1994). Atualmente alguns tipos de contaminantes são considerados poluentes globais dada a sua ampla dispersão, isto faz com que os efeitos destes agentes podem ocorrer distante do seu local de origem, justificando portanto o estudo das conseqüências da liberação destes produtos no meio, independente de estar ou não próximo a uma fonte pontual. Dentre os tipos de poluentes presentes em ambientes aquáticos naturais destacam-se: os metais pesados, organocloratos, cianidas, amônia, detergentes, ácidos, pesticidas, biocidas e hidrocarbonetos de petróleo (HEATH, 1995).

Dentre estes resíduos liberados pela atividade antrópica, os metais pesados são importantes do ponto de vista toxicológico, principalmente se considerarmos o seu efeito no funcionamento celular e os efeitos bioacumulativos na cadeia alimentar. Alguns metais pesados são essenciais, ou seja, necessários às funções metabólicas nos organismos vivos. No entanto, este pode ser tóxico ao organismo quando sua concentração encontra-se acima daquelas necessárias às funções

biológicas. Dentre os metais considerados essenciais podemos citar: o sódio (Na), fosfato (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), vanádio (V), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), Níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), molibdênio (Mo) e tungstênio (W); e os considerados não essenciais, que por sua vez são tóxicos para o organismo mesmo em baixas concentrações podemos citar: prata (Ag), cádmio (Cd), estanho (Sn), ouro (Au), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), alumínio (Al), estanho (Sn), cromo (Cr) e arsênio (As) (BEVERIDGE *et al.*, 1997).

Estudos sobre o potencial tóxico dos metais pesados podem ser realizados utilizando tanto animais provenientes de ambientes contaminados (indicando a resposta destes organismos aos diferentes contaminantes no ambiente natural), quanto provenientes de bioensaios, onde os animais são expostos experimentalmente em laboratório a um ou mais contaminantes sob condições controladas. Os bioensaios podem ser utilizados para estabelecer uma relação dose-dependente entre exposição, resposta de biomarcadores e efeito tóxico em órgãos-alvo.

O estanho é um metal conhecido desde a antiguidade, sendo encontradas referências a ele no Velho Testamento. Foi um dos primeiros elementos a serem utilizados pela tecnologia humana, através da sua utilização juntamente com o cobre (Cu) para a produção do bronze. Dentre os compostos de estanho, os orgânicos (organometais) são os que apresentam maior interesse toxicológico. Muitos destes xenobiontes são altamente lipossolúveis e os organismos aquáticos são particularmente vulneráveis a eles, especialmente devido ao fenômeno de bioacumulação e biomagnificação (KRAYBILL, 1976).

Os primeiros registros comerciais destes compostos datam de 1936, onde eram utilizados como estabilizadores de polímeros sintéticos. A produção de estanho orgânico tem aumentado muito, de cinco mil toneladas em 1955 para 35 mil toneladas em 1985, compondo 70% do total do estanho consumido no planeta (RABITTO, 2003). As principais formas de utilização do estanho orgânico são: estabilizantes em PVC, catalisadores, “antifouling” em tintas, em agroquímicos, preservação de madeira (OLIVEIRA RIBEIRO, 2002). O Tri(n-butil)estanho (TBT)

apresenta propriedades biocidas bastante conhecidas sendo um composto de alto potencial tóxico e de fácil expansão nos ambientes marinhos. Este composto foi amplamente aplicado entre a década de 1970 e 1980 como componente de pinturas *antifouling* (usadas contra incrustações de organismos marinhos) de pequenas embarcações e navios de grande porte (RABITTO, 2003). Entretanto, devido a sua grande toxicidade, o uso deste contaminante em pinturas de navios é controlado em muitos países, como Holanda, França, Austrália, Países Bálticos, Alemanha e Canadá; no entanto, a contaminação por este xenobionte continua persistindo em níveis crônicos nos organismos aquáticos (FENT, 1996).

Pode-se observar que existe um gradiente de toxicidade entre os compostos orgânicos de estanho mais comuns encontrados no ambiente: TBT (tributilestanho) > bis(tributil)estanho > DBT (dibutilestanho) > butilestanho > estanho IV. Através da biotransformação, o sistema citocromo P450 *in vivo* pode biotransformar o TBT em DBT na primeira fase oxidativa.

A toxicidade deste composto tem sido muito estudada desde a década de 70. Hoje sabe-se que o TBT atua sobre o sistema enzimático citocromo P450 diminuindo sua atividade e como há uma atuação do sistema P450 na detoxificação de vários tipos de xenobiontes, o seu comprometimento torna o organismo mais sensível quando está na presença de outros xenobiontes igualmente tóxicos. Além do efeito sobre o citocromo P450 o TBT ainda pode causar distúrbios na homeostase do cálcio e indução de apoptose em timócitos, inibição da fosforilação das bombas iônicas, danos em membranas biológicas e inibição de enzimas intracelulares (FENT, 1996). Os moluscos são especialmente sensíveis ao TBT e este composto pode afetar a calcificação das conchas e o aparecimento de um pseudo-hermafroditismo denominado imposex, entre outras alterações nos membros deste grupo (FERRARRO, 2003). Segundo LEE (1996), os animais filtradores, em especial pertencentes ao grupo dos moluscos, acumulam altas concentrações de TBT, e não têm um mecanismo eficiente de metabolização do xenobionte, o que pode estar relacionado com a baixa atividade de oxigenase nestes organismos.

Os compostos organoestanhos sofrem vários processos de degradação natural e conhecê-los leva a compreensão do comportamento destes compostos nos diferentes extratos e assim à caracterização do seu potencial tóxico para os organismos. De acordo com FENT (1996), o TBT apresenta uma resistência à degradação de 7 a 30 dias na água com temperaturas de verão para os padrões nórdicos e de 60 dias ou mais para temperaturas de inverno nesta região. Porém, o comportamento e a toxicidade deste composto e dos metais traços em ecossistema tropicais é pouco estudado, assim como o risco de contaminação humana.

Juntamente com o petróleo, o TBT é um contaminante comum em regiões portuárias e em áreas costeiras, por estarem estritamente relacionados com a atividade de navegação (o primeiro como combustível e o segundo pela sua utilização como *antifouling*), ocorrendo freqüentemente os dois juntos, o que aumenta a importância de se estudar estes contaminantes, inclusive em associação.

A descoberta dos benefícios do uso do petróleo e suas vantagens para o desenvolvimento fizeram com que houvesse um aumento do consumo de tal ordem que hoje se tornou um produto indispensável para garantir a qualidade de vida do homem. Entretanto, o beneficiamento de petróleo também trouxe problemas ambientais e sociais que têm se agravado com o aumento da demanda deste. O aumento da atividade petrolífera levou a ocorrência cada vez mais freqüente de acidentes nos últimos anos (como ocorrido na Baía de Guanabara – RJ, Rio Iguaçu – PR, Serra do Mar – PR, Plataforma de Campos – RJ, Porto de Paranaguá – PR e costa da Espanha, citando-se apenas os mais recentes) e tem afetado diretamente os ecossistemas aquáticos e preocupado a comunidade científica no sentido de desenvolver metodologias mais eficientes no diagnóstico dos efeitos deste contaminante sobre o ambiente natural. Estes derramamentos são mais freqüentes em ambientes marinhos, sendo despejados nestes ambientes 65% do total do óleo derramado (GROSSILING, 1976).

O petróleo, assim como os seus óleos derivados são misturas complexas de compostos orgânicos. De acordo com NEFF (1978), 75% dos constituintes do

petróleo são hidrocarbonetos de cadeias longas e curtas. Os hidrocarbonetos de cadeia curta são os que apresentam maior potencial tóxico aos organismos, sendo entretanto voláteis, permanecendo assim menos tempo no ambiente aquático (BRAUNER *et al.*, 1999).

Após atingir o ambiente aquático, o petróleo ou seus derivados pode passar por diferentes processos, como evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação, biodegradação e absorção pela biota, os quais determinam o destino destes produtos e seus impactos sobre os ambientes naturais. Destes processos, a dissolução com a água, ocorrida logo após o contato do contaminante com esta, tem uma importância especial do ponto de vista toxicológico. Embora dependa da turbulência do corpo d'água, geralmente a quantidade de óleo dissolvida na água é pequena. No entanto, é esta fração solúvel a causadora dos impactos mais imediatos aos organismos aquáticos, sendo assim considerado um importante determinante de toxicidade do petróleo e seus derivados em acidentes (SAEED & MUTAIRI, 1999).

A fração solúvel do petróleo e seus derivados na água (FSA) é uma mistura complexa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's), fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (ANDERSON *et al.* 1974; MACKAY & SHIU, 1976).

Vários métodos têm sido utilizados para se detectar os efeitos de contaminantes ambientais em organismos vivos. No entanto, nos últimos anos os estudos têm se concentrado principalmente na fase pré-patológica da exposição, ou seja, detectar os efeitos antes mesmo que os organismos possam sofrer algum dano irreparável em sua fisiologia ou metabolismo. Para esta verificação na fase pré-patológica são utilizados os biomarcadores, os quais são importantes na caracterização e diagnóstico dos efeitos. Um biomarcador é uma resposta a um agente tóxico presente no ambiente que pode ser um parâmetro morfológico ou fisiológico alterado (MELANCON, 1995). Portanto os biomarcadores integram sistemas biológicos indicando contaminação ou intoxicação, em diferentes níveis de organização biológica de um organismo, representando um de seus processos

constitutivos, o que pode ser usado como indicador de exposição subletal.

A análise de parâmetros morfológicos é um importante e rápido método na detecção dos efeitos agudos e crônicos de exposição em vários órgãos dos seres vivos, a qual tem a vantagem de permitir uma melhor visualização do efeito a níveis celular, tecidual e sistêmico. Tais parâmetros em associação com biomarcadores moleculares permitem que se tenha uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos dos contaminantes no organismo estudado, conhecendo em alguns casos o princípio do mecanismo ou os princípios envolvidos com as respostas toxicológicas (HINTON *et al.*, 1992).

Dentre os biomarcadores moleculares conhecidos, o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) tem sido tratado como um mecanismo biológico natural de defesa de “primeira linha” para proteção contra toxinas ambientais e endógenas em organismos aquáticos (KURELEC & PIVCEVIC, 1989; KURELEC, 1997; EPEL, 1998), e a sua atividade de transporte tem se consolidado como biomarcador molecular de exposição. Por ser um mecanismo de transporte de membrana mediado (especialmente pela Pgp, podendo ser também por outras proteínas pertencentes à mesma subfamília desta) ele apresenta características como apresentar uma cinética de saturação, em que a partir de um momento (no caso do MXR, tende a ser próximo dos quinze minutos de transporte) o transporte encontra-se saturado. Outra característica deste tipo de transporte transmembrana é a especificidade a substância a ser transportada. No caso do MXR, não se tem conhecimento de como ocorre o reconhecimento destas substâncias, já que ele transporta várias, sendo a única característica comum encontrada até o momento entre estas substâncias é serem moderadamente hidrofóbica (ENDICOTT & LING, 1989; TOOMEY & EPEL, 1993.), ou seja, apresentar uma região hidrofóbica sem ser porém totalmente hidrofóbica. Outra característica é a capacidade de inibição deste tipo de transporte, e para o mecanismo MXR temos como exemplos de substâncias inibidoras do mecanismo o verapamil, quinidina, vincristina e reverpina, entre outras (KURELEC, 1992), não sendo ainda conhecido o mecanismo de ação

destes inibidores sobre o MXR (ENDICOTT & LING, 1989).

O MXR é um análogo ao mecanismo de resistência a multidrogas (MDR), descrito em células tumorais de mamíferos por JULIANO & LING (1976). Ambos funcionam transportando para o meio extracelular compostos presentes no ambiente intracelular e que a célula reconhece como xenobióticos e possuem como entidade responsável a glicoproteína-P (Pgp). O mecanismo MXR tem se apresentado com grande implicação para a ecotoxicologia, levando esta a reavaliar parâmetros e conceitos já estabelecidos, como exposição, consumo, bioacumulação e toxicidade, e o surgimento de uma nova classe de químicos perigosos, os quimiossensibilizadores (KURELEC *et al.*, 1997). Estes são tidos como compostos não tóxicos, entretanto capazes de bloquear o bombeamento dependente de energia pela Pgp e deste modo sensibilizar a célula a diferentes xenobiontes já presentes no meio e aos próprios produtos endógenos, devido a sua acumulação no meio intracelular (KURELEC, 1992; KURELEC *et al.*, 1995b). Estes agentes bloqueiam o mecanismo de resistência através da competição pelo sítio de ligação a Pgp, diminuindo assim a capacidade de *binding* e de transporte dos substratos por esta proteína (SARKADI & MULLER, 1997).

A Pgp (figura 1) é pertencente à superfamília de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) e possui duas metades homólogas, cada qual com seis domínios transmembrana e um domínio de ligação para o ATP, conhecido como *nucleotide binding domain* ou NBD. Estes possuem dois motivos denominados Walker A e B, os quais são separados por uma ponte de aproximadamente 100 aminoácidos a qual contém um dodecapeptídeo na denominada região C ou “seqüência de assinatura ABC” (“*ABC signature*” *dodecapeptide*), a qual se localiza mais próxima do motivo Walker B (GOTTESMAN & AMBUDKAR, 2001). As metades homólogas não são idênticas e são separadas entre si por um polipeptídeo flexível de ligação e a interação destas metades é essencial para o funcionamento coordenado da molécula (AMBUDKAR *et al.*, 1999). Esta glicoproteína é conservada em tamanho e reatividade imunológica ao longo das espécies e está constantemente associada ao

mecanismo de resistência a multidrogas, apontando para uma forte pressão de seleção em razão de suas funções fisiológicas (BRADLEY *et al.*, 1988). HORIO *et al.* (1988) demonstrou que a Pgp é ligadora tanto de drogas quanto de ATP, comprovando também a dependência de energia (ATP ou GTP) para o transporte de drogas.

A interação entre a Pgp e os xenobióticos não se restringe apenas a indução da síntese desta proteína, podendo estar ligado apenas a habilidade desta de transportar seus substratos. Compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) induzem a síntese de Pgp e podem também modular o transporte dos seus substratos, como ocorre no caso dos PAH's oriundos do óleo Diesel. A princípio, a presença de contaminantes induz a síntese da Pgp e organismos provenientes de águas contaminadas apresentam uma maior resistência a xenobiontes, tolerando doses mais elevadas, o que é demonstrado por ACHARD *et al.* (2004) em relação a contaminação de *Corbicula fluminea* por diversos metais pesados.

Para ser efetuada a análise do efeito da fração solúvel do petróleo em água (FSA) e do TBT sobre a atividade transportadora da Pgp, este trabalho utilizará como modelo biológico de estudo a espécie de molusco *Perna perna* (figura 1), animal amplamente utilizado em biomonitoramento e trabalhos de toxicidade ambiental. A escolha desta espécie como modelo baseia-se no fato de apresentar vida sésil quando adulto, ser um organismo filtrador, ter uma grande capacidade de bioacumulação e grande resistência a ambientes poluídos respondendo metabolicamente a estas contaminações.

O mexilhão (*Perna perna*) é encontrado na costa oeste do atlântico, desde a Ilha Margarita e Cumaná (Venezuela) até a Ilha de Lobos e Punta del Este (Uruguai), sendo abundante entre Rio de Janeiro e Santa Catarina e é o mitilídeo mais abundante no litoral brasileiro, tendo grande importância econômica e

alimentar nas regiões onde ocorre em maior quantidade. Este organismo é classificado como descrito abaixo:

Phylum: Mollusca

Classe: Bivalvia

Sub-Ordem: Pteriomorpha

Ordem: Mytiloidea (Ferussac, 1822)

Família: Mytilidae (Rafinesque, 1815)

Sub-Família: Mytilinae (Rafinesque, 1815)

Espécie: *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

FIGURA 1 – MEXILHÕES *PERNA PERNA*



O seu cultivo encontra-se em franca expansão no Estado de Santa Catarina, sendo este o maior produtor nacional produzindo anualmente 13 toneladas para o consumo humano (FRANCO, 1993). A produção do mexilhão *P. perna* possui uma crescente importância socioeconômica, tendo se destacado como alternativa na atividade de aquicultura neste estado (PESSATTI, 2002).

Tanto a respiração quanto a alimentação nestes animais é realizada pelas brânquias. A circulação de água necessária para as trocas gasosas é realizada através do batimento dos cílios laterais destes órgãos enquanto que a captura das partículas presentes na água é pela retenção de partículas pelas lamelas, as quais funcionam como filtros (BAYNE, 1976). Mtilídeos, como o mexilhão *P. perna*, são indicados como modelos para este tipo de experimento devido a sua vida sésil, sua distribuição natural nas águas costeiras e principalmente por sua capacidade de bioacumulação de diferentes xenobiontes presentes nestas águas.

O desenvolvimento de metodologias que proporcionem um melhor entendimento do impacto de metais pesados como o tributilestano no ambiente é fundamental para que se possam evitar os danos decorrentes da exposição a este xenobionte e assim estabelecer de forma mais cautelosa o limite de emissão deste contaminante.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Caracterizar os efeitos da fração solúvel do petróleo em água (FSA) e do tributilestanho (TBT), em relação à concentração e ao tempo de exposição, sobre o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) no mexilhão *Perna perna*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade de transporte da rodamina B pelo mecanismo MXR em brânquia de mexilhão *P. perna*;
- Analisar o efeito de diferentes concentrações (entre 15 e 100%) de FSA de petróleo após 24 horas de exposição sobre o efluxo de rodamina B;
- Analisar o efeito de diferentes concentrações (entre 25 e 500 ng/L) de TBT após 24 horas de exposição sobre o efluxo de rodamina B.
- Verificar a existência de interações (sinergismo ou antagonismo) entre os contaminantes.
- Estudar o efeito dos contaminantes na estrutura do tecido branquial através de microscopia eletrônica de varredura.

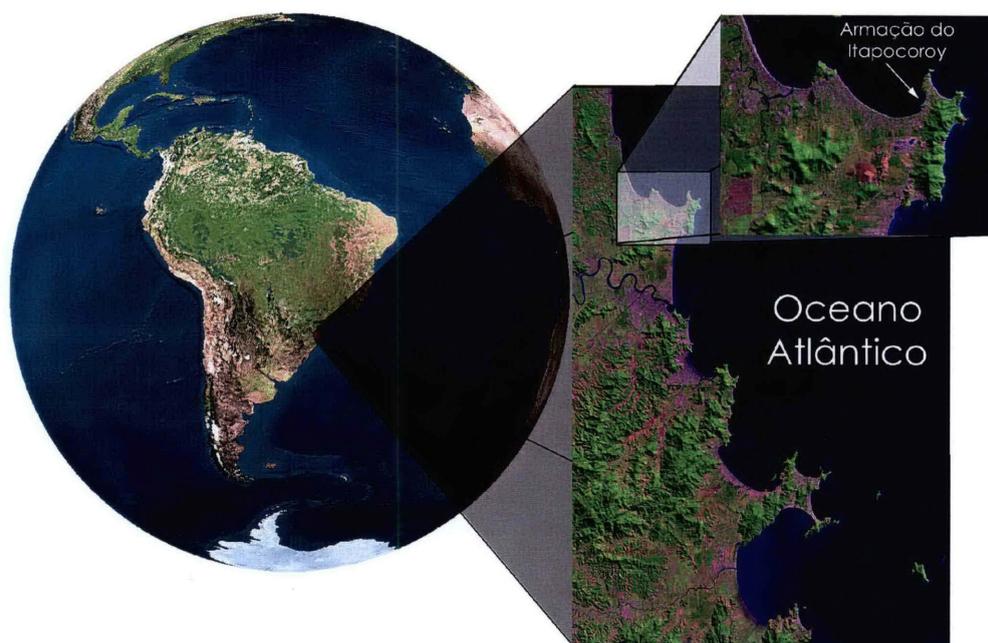
2. MATERIAL E METODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados para a realização dos bioensaios mexilhões da espécie *Perna perna*, adultos, medindo entre 5 e 7 cm, coletados na praia da Penha, Armação do Itapocoroy, uma região do campo de cultivo de mexilhões do *Campus V* da Universidade do vale do Itajaí, no estado de Santa Catarina (figura 2). Esta é uma região considerada despoluída e também uma região de circulação marinha menos intensa e que recebe um aporte importante de matéria orgânica através da pluma do rio Itajaí-Açu, apresentando-se como uma região propícia e extensivamente utilizada para aquicultura, especialmente para o cultivo de mexilhões e ostras (SCHETTNI *et al.*, 1999). Os tamanhos entre 5 e 7 cm foram utilizados devido a idade do organismo (determinada pelo tamanho da concha) influenciar a capacidade transportadora de rodamina B do mecanismo, sendo a atividade mais expressiva em organismos acima de 50mm de concha segundo PESSATTI, 2002. Segundo este mesmo autor, o sexo não altera o padrão de atividade do mecanismo, motivo pelo qual foram utilizados aleatoriamente organismos de ambos os sexos.

Após a coleta, os animais foram limpos e levados ao Laboratório de Cultivo de Organismos Marinhos no *Campus I* do CTTMar (UNIVALI), onde foram mantidos para a aclimatização por um período mínimo de 5 dias em água do mar filtrada (0,5µm) proveniente do mesmo local de coleta, com aeração constante fotoperíodo de 12 horas com densidade de 2,5 indivíduos por litro de água. Os animais eram alimentados diariamente com o fitoplâncton *Chaetoceros gracilis*, cultivado no próprio laboratório e a limpeza dos potes sendo feita a cada dois dias, através da troca total da água durante o período de aclimatização.

FIGURA 2 – LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO



Destaque para a Estação Experimental de Maricultura da Universidade do Vale do Itajaí, Armação do Itapocoroy, Penha – SC – Brasil.

2.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO (FSA)

O FSA foi obtido segundo ANDERSON *et al.* (1974). Em frascos de vidro foi colocada uma parte do petróleo cedido para dez partes de água do mar obtida no mesmo local de coleta dos mexilhões. O volume total varia de acordo com as concentrações necessárias para o experimento. A água com o petróleo foi agitada continuamente por 24 horas em temperatura ambiente com auxílio de um agitador magnético e para se evitar a volatilização dos hidrocarbonetos mais voláteis o recipiente foi fechado com um plástico PVC. Após a agitação o óleo foi separado do FSA através da utilização de um funil de separação, sendo o petróleo posteriormente descartado.

As amostras de petróleo foram cedidas pela Refinaria da Petrobrás de Araucária (REPAR), Araucária, PR, que tem como origem a Bacia Petrolífera de Campos, Campos – RJ.

2.3. BIOENSAIOS

Foram realizados cinco bioensaios para testar a toxicidade de FSA e do TBT sobre o mecanismo MXR. Os dois bioensaios iniciais tinham como objetivo obter uma concentração onde não se obtivesse efeito no mecanismo durante o tempo de exposição (24 horas), sendo definida para utilização nos bioensaios seguintes a concentração que causasse maiores alterações na atividade do mecanismo MXR. Para tanto, no primeiro, utilizando como xenobionte o FSA, foram aplicadas concentrações de 0, 15, 25, 33, 50, 75 e 100% sendo expostos 3 indivíduos para cada concentração por um período de 24 horas em potes com capacidade de 3L e aeração e temperatura constante. No segundo, o contaminante utilizado foi o TBT e as concentrações aplicadas foram de 0, 25, 55, 100, 300 e 500 $\eta\text{g/L}$ pelo mesmo período de tempo e nas mesmas condições. Para ambos contaminantes, foram utilizadas concentrações encontradas no ambiente, sendo usado FENT (1996) e TONG *et al.* (1995) como referência para determinação das doses para o TBT e para o FSA foi utilizada como referencia AKAIISHI (2003).

Para verificar a possível existência de interações entre os contaminantes foram feitos outros dois bioensaios: em cada um deles um grupo de indivíduos era exposto à concentração que causou maior efeito nos bioensaios anteriores de um dos contaminantes enquanto a dose do outro era variada, durante um período de exposição de 24 horas. As doses escolhidas para serem fixadas foram 33% para o FSA e 25 $\eta\text{g/L}$ para o TBT.

2.4 ENSAIO DO TRANSPORTE (EFLUXO) DE RODAMINA B PELO MECANISMO MXR

Para o ensaio de efluxo foi utilizado o método de CORNWALL *et al.* (1995) com pequenas modificações, seguindo o protocolo utilizado por PESSATTI *et al.* (2002). Os mexilhões foram dissecados para a retirada das brânquias as quais foram transferidas para água do mar filtrada (ou água na mesma concentração a qual foi submetida, no caso dos bioensaios). Após a retirada manual de todo o muco com o auxílio de pinças de ponta fina, foram cortadas as bordas dorsais dos braços descendentes de cada lamela e em seguida cortadas em seções em torno de 25 mm² de área e incubadas em Rodamina B 1µmol.L⁻¹ (preparada com água do mar na mesma concentração do bioensaio) por 60 minutos. Após este tempo estas seções foram removidas e colocadas em água do mar na mesma concentração do bioensaio para que se promovesse o efluxo. Para os grupos controle, foram feitas determinações da de fluorescência nos tempos de 0,5, 5,15, 30 e 60 minutos de efluxo. No caso dos bioensaios para determinação da concentração, foram medidos apenas os tempos de 5 e 15 minutos. O tempo de 5 minutos representa o aumento na atividade de transporte, onde a curva hiperbólica formada pela cinética do transporte do MXR, o qual é um transportador ativo, encontra-se em ascensão e o tempo de quinze minutos é o momento onde a curva tende a atingir a estabilidade ou o seu platô. Com a utilização destes tempos pudemos ter uma representação da cinética do transporte feito pelo MXR na presença destes contaminantes.

A intensidade de fluorescência das seções branquiais foi medida em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 equipado com filtro U-MWG (filtro de excitação de 510-550 nm e filtro de bloqueio de emissão acima de 590 nm) em campo de diafragma fechado de modo que o tempo de exposição (segundos) traduzisse a intensidade de fluorescência de apenas um filamento

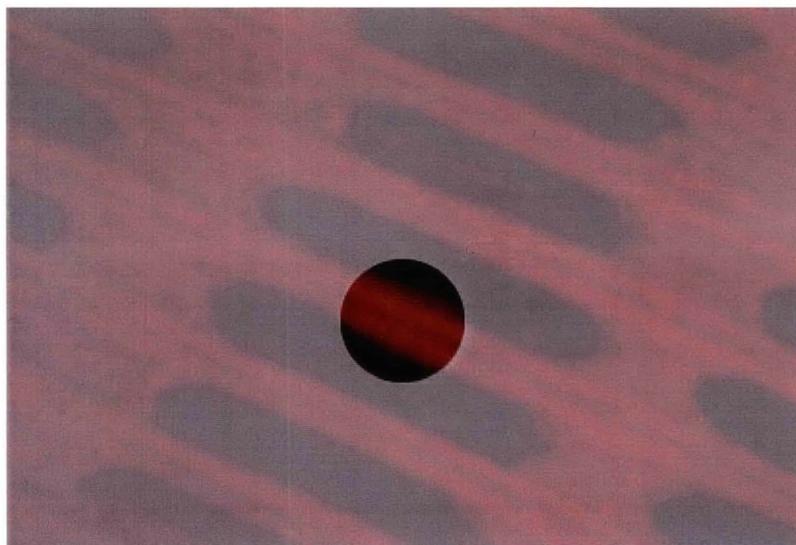
branquial (figura 3). A luz emitida pelas células foi quantificada por um fotosensor Olympus PM20 acoplado ao microscópio, regulado em ISO 100, comutador de luz nas objetivas e no fotosensor com compartilhamento entre microscópio e câmera, condição de foco Auto AV e ajuste de exposição 4,0 (sensibilidade máxima). Desta forma, a fluorescência quantificada refletia a concentração intracelular de rodamina B quando transformada pela fórmula: $Rod = ((1/Texp) - 0,037211) / 0,035239 - Rod\ branco$, obtida por PESSATTI *et al.* (2002) em sua curva de calibração (onde Texp significa o valor medido pelo aparelho e Rod branco significa a fluorescência basal da brânquia, sem ser submetida a rodamina). Foi evitado o tecido conectivo interfilamentar, por ter espessura e fluorescência variáveis, sendo as leituras feitas somente no lado abfrontal dos filamentos (CORNWALL, *et al.*, 1995).

Foram determinadas as fluorescências de 30 filamentos o mais imediatamente possível após a montagem da lamina e as médias e os intervalos de confiança utilizados foram de 95%.

2.5. MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA

Foram coletadas secções de brânquias para a análise em microscópio eletrônico de varredura nos bioensaios onde se teve uma combinação dos contaminantes, as quais foram fixadas com auxílio do fixador karnovisk. Após a fixação, as secções passaram por uma bateria crescente de álcool e posteriormente submetidas aos procedimentos de ponto crítico, onde se tem a retirada do álcool das peças e sua substituição por CO₂, o qual evapora deixando a peça totalmente desidratada.

Figura 3 - seção branquial em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 em campo de diafragma fechado - intensidade de fluorescência de apenas um filamento branquial



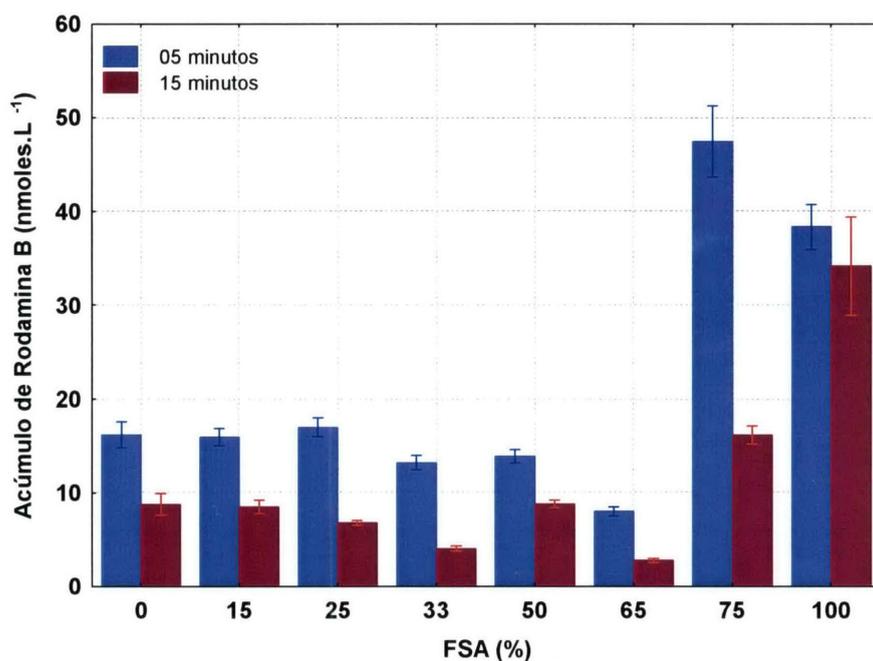
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, com um nível de significância de 0,05% seguido do Teste de Tukey, com o mesmo número de significância.

3. RESULTADOS

Os animais submetidos ao FSA (Gráfico 1) não apresentaram grande variação na resposta do MXR a este contaminante, mantendo-se as taxas de efluxo sempre próximas ao controle, com exceção dos grupos 65, 75 e 100%. Estes grupos foram identificados a partir da realização do teste ANOVA ($F=253,9862018$ e $P=0$) seguido de Tukey, ambos com nível de significância de 0,05%.

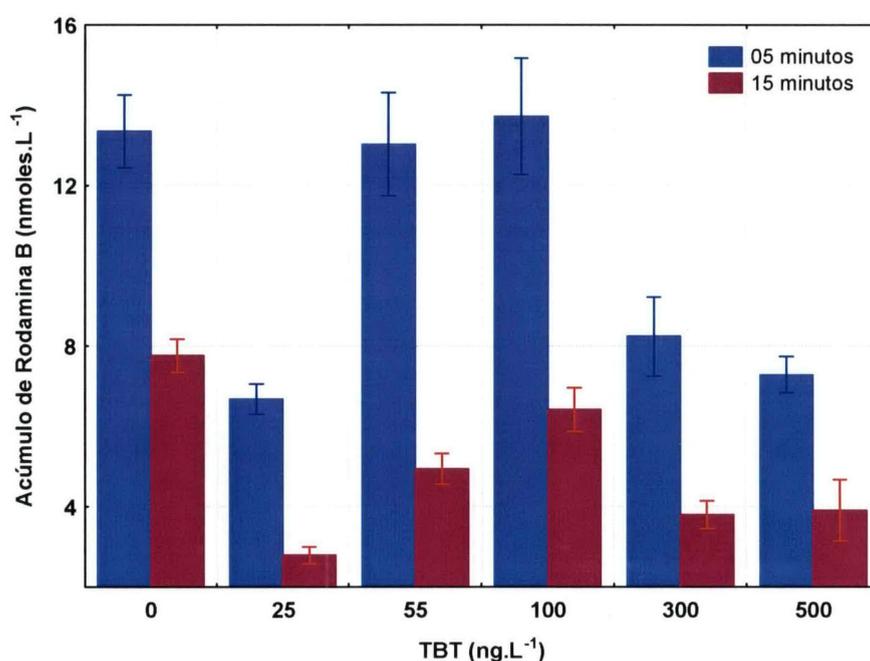
Gráfico 1 - Acúmulo de Rodamina B (nmoles.l⁻¹) em Brânquias expostas ao FSA. Foi realizado o teste ANOVA, com $F = 253,9862018$ e $P = 0$. O Teste de tukey identificou os grupos 65, 75 e 100% como sendo significativamente diferentes em relação aos demais.



Em relação às brânquias expostas ao TBT (Gráfico 2), verificou-se, a partir da realização dos mesmos testes mantendo-se os níveis de significância, que

todos os grupos diferem do controle, entretanto o grupo de 100 ng/L difere dos demais grupos. Os dados demonstram a inibição do mecanismo pelo TBT, inclusive no grupo de 100 ng/L, tendo este uma menor taxa de efluxo. No teste ANOVA o F foi igual a 58,6775568 e P igual zero.

Gráfico 2 - Acúmulo de Rodamina B (nmoles.l-1) em Brânquias expostas ao TBT. Foi realizado o teste ANOVA, com $F = 58,6775568$ e $P = 0$ para significância de 99,95%. O Teste de tukey, para $p > 0,05\%$, identificou os grupo exposto a 100 ng/L como sendo significativamente diferentes em relação aos demais.



Ao se contaminar os animais com TBT e FSA concomitantemente observou-se uma variação da resposta conforme qual xenobionte tinha sua concentração variada, entretanto com ambos apresentando uma tendência a inibição do mecanismo. Quando se manteve o FSA fixo (gráfico 3) na concentração de 33%, o único grupo que foi estatisticamente diferente dos demais, incluindo o grupo controle, foi o FSA associado ao TBT 55 ng/L. estes grupos apresentaram a mesma tendência do FSA quando isolado a manter a taxa de efluxo próxima ao controle. No

teste ANOVA o F foi igual a 36,68974 e P igual a $1,03E + 25$.

Já quando se manteve o TBT fixo (gráfico 4) em 25 ng/L, o perfil encontrado foi parecido com o do TBT quando isolado. O grupo que apresentou diferença significativa em relação aos demais, inclusive ao controle foi o grupo onde o TBT era associado ao FSA 15%. No teste ANOVA o F foi igual a 444,796 e P igual a zero.

Gráfico 3 - Acúmulo de Rodamina B (mmoles.l-1) em Brânquias expostas ao FSA 33% e as diferente concentrações de TBT. Foi realizado o teste ANOVA, com $F = 36,68974$ e $P = 1,03E+25$ para significância de 99,95%. O Teste de tukey, para $p > 0,05\%$, identificou o grupo exposto a 55 ng/L como sendo significativamente diferentes em relação aos demais.

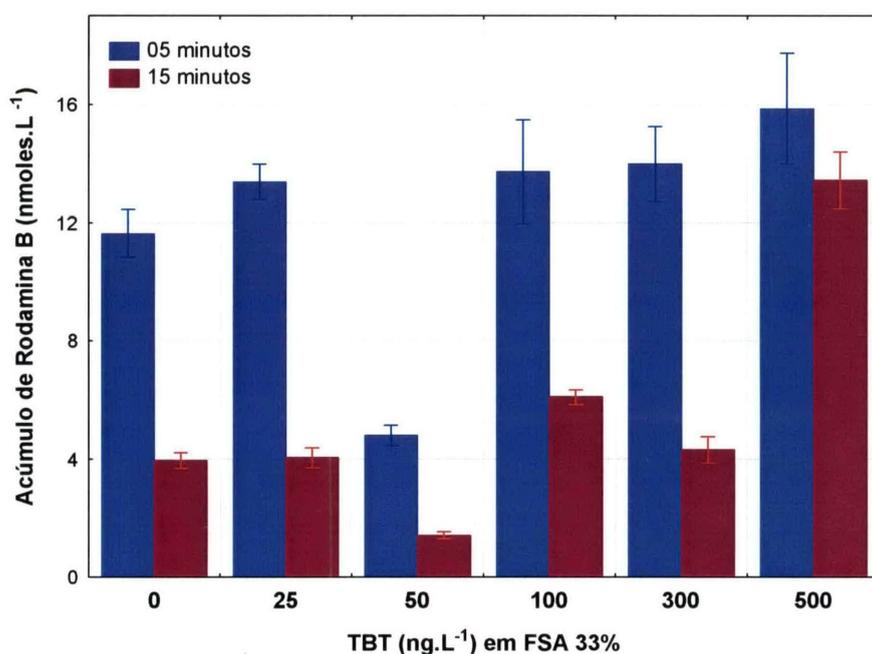
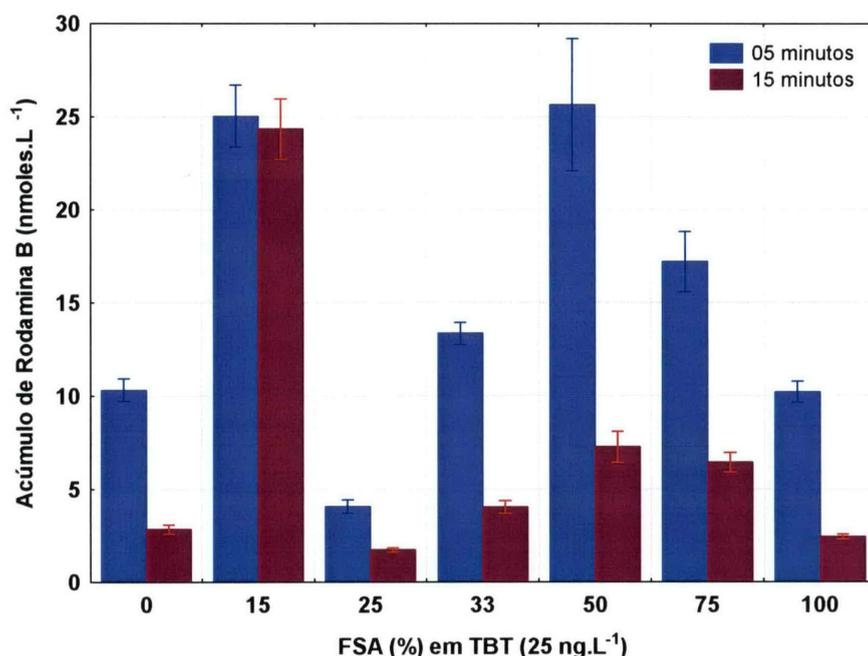


Gráfico 4 - Acúmulo de Rodamina B (mmoles.l-1) em Brânquias expostas ao FSA 33% e às diferentes concentrações de TBT. Foi realizado o teste ANOVA, com $F = 444,796$ e $P = 0$ para significância de 99,95%. O Teste de tukey, para $p > 0,05\%$, identificou os grupo exposto a TBT 25ng/L e FSA 15% como sendo significativamente diferentes em relação aos demais.



Nas análises de microscopia eletrônica de varredura os animais controles apresentaram as brânquias com os filamentos uniformemente distribuídos, não apresentando união entre os filamentos. Os filamentos possuíam uma espessura aproximada e tendência a manter uma distância constante entre os filamentos adjacentes, o tecido mostrando-se organizado. Vale salientar que esta análise foi realizada na porção contrária (região externa do tecido branquial) à analisada no microscópio de epifluorescência para a avaliação da taxa de efluxo, motivo pelo qual as trabéculas do tecido conectivo interfilamentar encontravam-se ausentes.

Já os cílios encontravam-se organizados, podendo facilmente serem individualizados e não mantendo contato com cílios de outros filamentos. Foram encontradas duas formas de organização dos cílios nos filamentos do grupo controle: em uma delas, os cílios encontravam-se voltados para o centro do filamento (Figura

3, prancha 1), estando muito próximos uns aos outros; já na outra forma de organização os cílios encontravam-se voltados para a parte externa do filamento, estando dispersos e estes sendo mais facilmente individualizados. As duas formas de organização foram consideradas normais.

Já nos grupos contaminados foram encontradas basicamente duas alterações, uma delas restrita ao grupo onde o TBT se mantinha constante e o FSA variava e a outra presente nos dois tipos de contaminação.

A primeira alteração, que se restringiu ao grupo onde o TBT se mantinha constante e o FSA variava se caracterizava pelo enrolamento dos cílios em torno de um eixo, formando uma série de grupamentos circulares que aparentam ser formados por um número reduzido de cílios cada (devido ao seu diâmetro reduzido) e os quais apareciam em grande número, sempre próximos. Este tipo de alteração ocorreu em todas as contaminações deste grupo.

Já a segunda alteração encontrada se apresentava como um emaranhado de cílios, provindos de dois filamentos adjacentes, os quais formavam algo com uma ponte entre estes filamentos, envolvendo um grande número de cílios. Ocorreu em todas as contaminações, formando áreas extensas com todos os filamentos interligados, dando a brânquia um aspecto acolchoado. Pode ser observada uma evolução da extensão deste efeito conforme se aumentava a concentração do xenobionte variável, o que ocorreu nos dois grupos.

Prancha 1 - Ultraestrutura das Branquias do mexilhão *Perna*

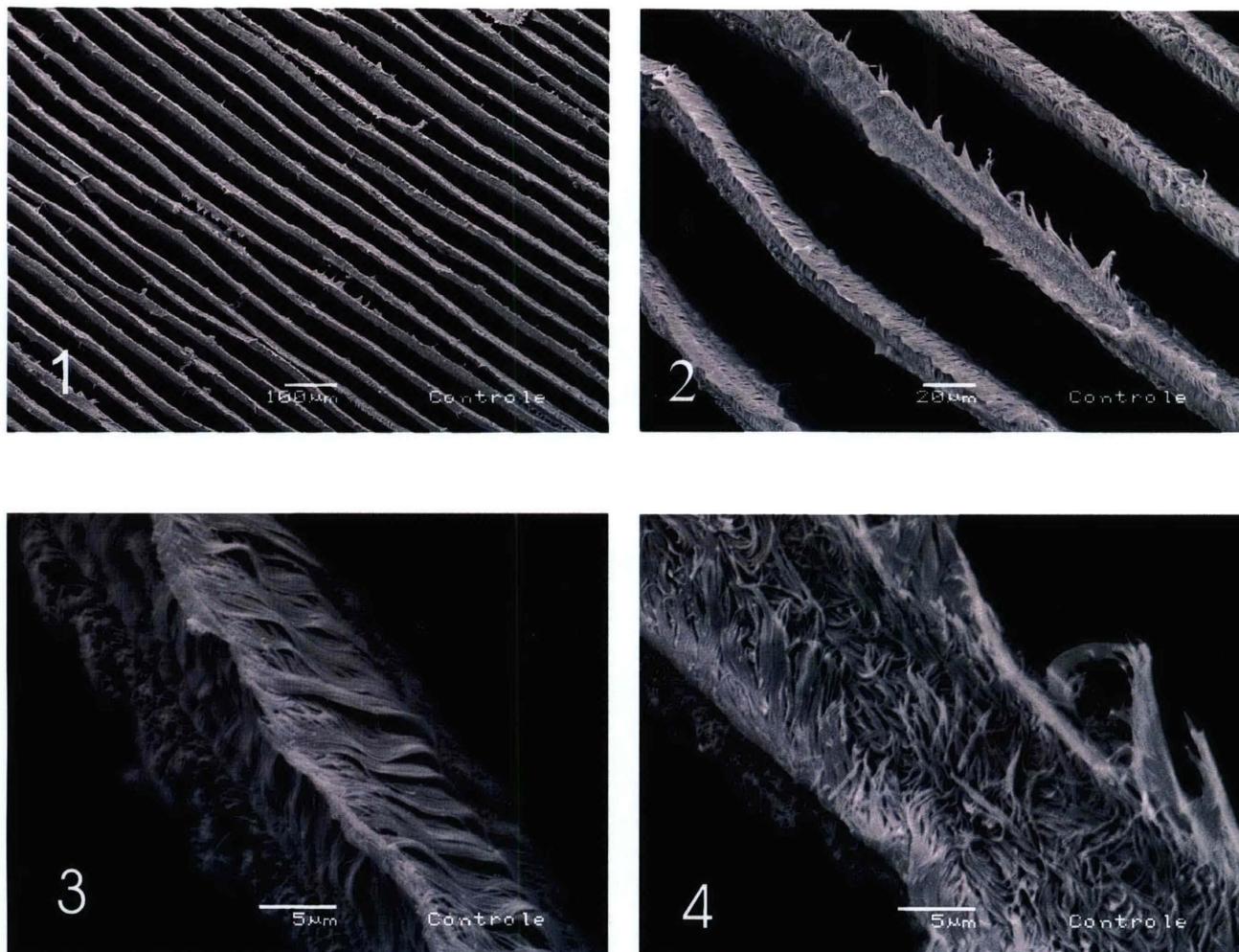


Figura 1 e 2 - Brânquia do grupo controle. As figuras mostram os filamentos brânquiais podendo ser individualizados, sem ligação com os seus adjacentes. 110X e 550X.

Figura 3 e 4 - Brânquia do grupo controle. As figuras mostram filamentos separadamente, cada um com uma diferente organização ílar sem que os cílios de um filamento tenham contato com os filamentos próximos. Note que especialmente na figura 4 os cílios podem ser individualizados. 3300X.

Prancha 2- Ultraestrutura da brânquia do mexilhão *Perna perna* exposto á TBT 25 ng/L e FSA variando entre 15 e 100%

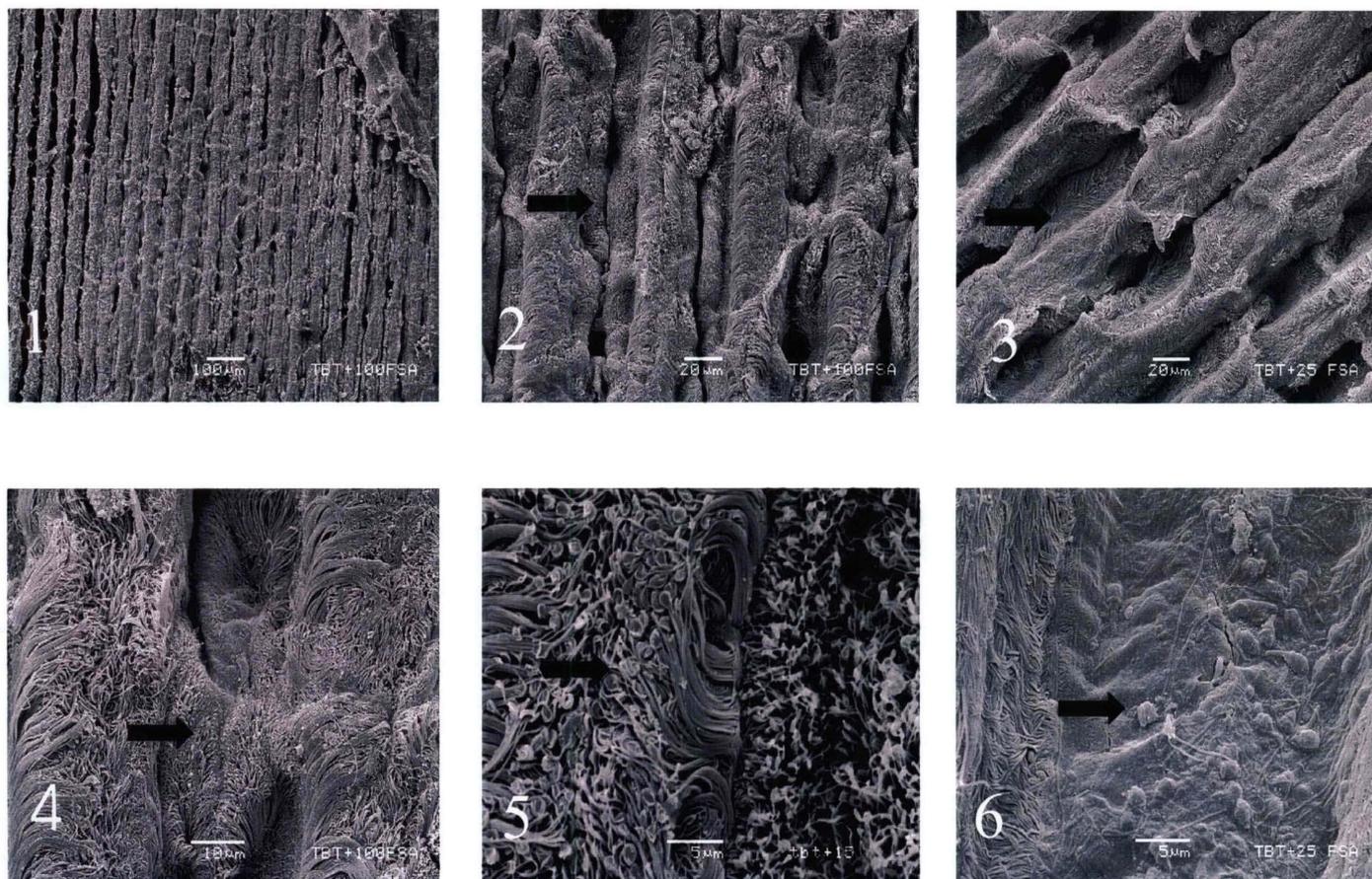


Figura 1- Brânquia exposta a TBT 25 ng/L e FSA 100%. A figura mostra a alteração do ordenamento dos cílios, formando pontes que ligam os filamentos brânquiais adjacentes. 110X.

Figura 2 e 4 - Brânquia exposta a TBT 25 ng/L e FSA 100%. As figuras mostram em detalhe o desarranjo dos cílios ligando as lamelas adjacentes (setas). 550X e 1600X.

Figura 3 - Brânquia exposta a TBT 25 ng/L e FSA 25%. A figura mostra a mesma alteração (seta) encontrada em uma menos concentração de FSA. 550X

Figura 5 - Brânquia exposta a TBT 25 ng/L e FSA 15%. A figura mostra outra alteração encontrada nos grupos onde o TBT manteve-se fixo e se variou o FSA. Esta alteração se caracteriza pelo aparecimento de grupamentos ciliares de forma circular (seta) e em grande número. 3300X.

Figura 6 -Brânquia exposta a TBT 25 ng/L e FSA 25%. A figura mostra as duas alterações encontradas ocorrendo conjuntamente. O grupamento circular (seta) ocorre em uma região de ligação de dois filamentos adjacentes formados pelo entrelaçamento dos cílios.

Prancha 3 - Ultraestrutura da brânquia do mexilhão *Perna perna* exposto á FSA 33% e TBT variando entre 25 e 500 ng/L.

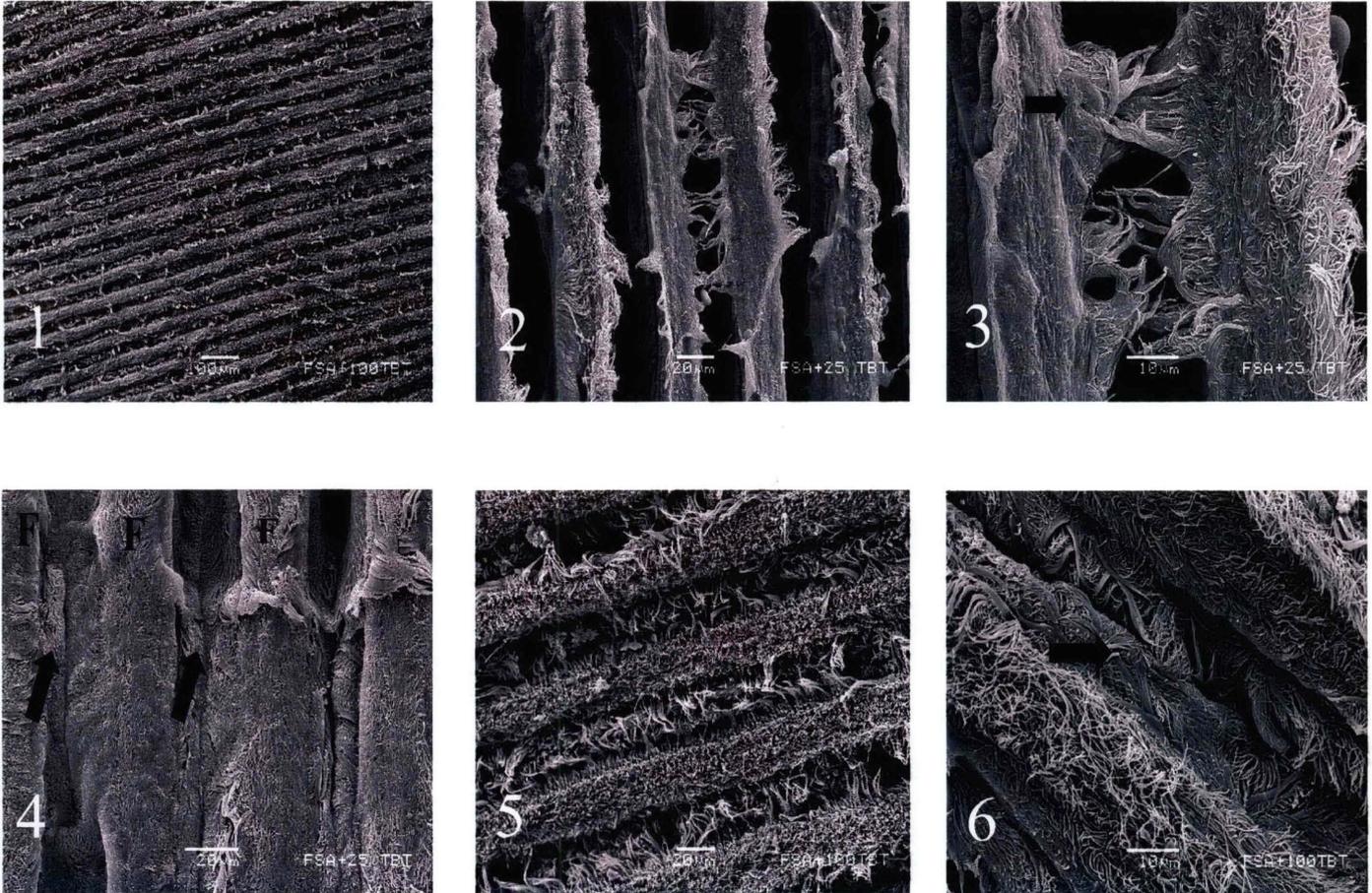


Figura 1- Brânquia exposta a FSA 33% + TBT 100 ng/L. A figura mostra a alteração na disposição dos cílios, formando ligações entre os filamentos. 110X.

Figura 2 e 3 - Brânquia exposta a FSA 33% + TBT 25 ng/L. As figuras mostram o início da formação das pontes entre os filamentos, a partir do entrelaçamento dos cílios. Detalhe mostrado na figura 3, onde a seta aponta esta formação. 550X e 1600X.

Figura 4 - Brânquia exposta a FSA 33% + TBT 25 ng/L. A figura mostra novamente a formação de ligações entre os filamentos (F), aqui em estágio mais adiantado, estando os filamentos completamente ligados pelo entrelaçamento dos cílios (setas). 550X.

Figura 5 - Brânquia exposta a FSA 33% + TBT 100 ng/L. A figura mostra o entrelaçamento dos cílios em estágio mais inicial. 550X.

Figura 6 - Brânquia exposta a FSA 33% + TBT 100 ng/L. A figura mostra o entrelaçamento dos cílios em estágio intermediário (seta). 1600X.

4. DISCUSSÃO

Tanto o TBT quanto hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's), são contaminantes comumente encontrados em regiões portuárias, sendo de vital importância o estudo destes contaminantes em conjunto e isoladamente sobre organismos existentes nestas regiões, como o mexilhão *Perna perna*.

O mecanismo de resistência a multixenobioticos se apresenta como um biomarcador subletal, apresentando alterações antes de se causar dano tecidual nos indivíduos e garantindo assim que sistemas básicos para a sobrevivência dos mesmos não sejam afetados.

O TBT é um organometal muito estudado pela ecotoxicologia devido a ampla utilização pelo homem e sua conseqüente descarga no meio ambiente. Apesar disso, não foi encontrada na literatura estudos que relacionem o TBT com o mecanismo MXR. Foram encontrados, entretanto, dados da ação de outros metais pesados sobre este mecanismo, como ACHARD *et al.* (2004), analisaram o efeito de zinco, cobre mercúrio inorgânico e cádmio sobre o a glicoproteína-P de *Corbicula fluminea*. Estes utilizaram para a detecção da Pgp o método *Western Blotting*, encontrando uma relação positiva entre os níveis de MXR e o nível de contaminação pelo metal. EUFEMIA & EPEL (1998) encontraram os mesmos resultados em moluscos marinhos contaminados com pesticida através do mesmo método de avaliação. Foi feito um *western blotting* com material coletado durante a exposição a 100 η g/L de TBT e do grupo controle para se quantificar a Pgp, entretanto os resultados encontrados foram diferentes do citado em bibliografia, sem ocorrer diferença entre o grupo tratado e controle. Como este foi apenas um teste piloto, os resultados não são conclusivos, devendo ser repetidos para se confirmar o mesmo e excluir a hipótese de erro experimental.

PESSATTI *et al.* (2002) encontraram a mesma tendência a indução do mecanismo utilizando ambos o método de avaliação da taxa de transporte da rodamina B. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com os

autores citados o que demonstra que o TBT mesmo sendo orgânico tende a agir como um metal pesado inorgânico em concentrações existentes no meio ambiente, como as utilizadas neste trabalho.

Não se sabe ainda como ocorre a indução pelos metais pesados nestes organismos, existindo várias hipóteses, como o aumento da expressão do gene do *mdr 1*, que codifica a Pgp, pela presença destes xenobiontes; o aumento da taxa de tradução do mRNA deste gene; ou o aumento da taxa de ativação da Pgp em si. CHIN *et al.* (1990) cita que o promotor do gene *mdr1* possui uma região de ligação com o cádmio, sendo responsável pelo aumento na transcrição do gene de oito vezes, levando a um aumento do mRNA disponível para tradução e conseqüente aumento na quantidade de Pgp. Pela sua tendência a agir como metais pesados inorgânicos, é possível que o TBT também possa ligar-se a este promotor e aumentar a taxa de transcrição do gene *mdr 1*. São ainda necessários mais estudos para se determinar a forma exata de atuação do TBT sobre o mecanismo, e sendo assim saber como este contaminante altera a taxa de efluxo da rodamina B pela Pgp.

Em relação à contaminação pelo FSA, foram encontrados na literatura diversos autores que citam o efeito dos PAH's, principais componentes deste contaminante sobre o mecanismo MXR. Os dados encontrados em literatura relatam uma indução do MXR por contaminantes ricos em PAH's (como o óleo diesel e o óleo bruto, utilizados respectivamente por KURELEC *et al.*, 1995 e BARD *et al.*, 1998), bem como por um único tipo de PAH, como o BaP (FONTANA *et al.*, 1999). PESSATTI *et al.* (2002) relatou que o óleo diesel, no tempo utilizado neste trabalho, apresentou uma indução do mecanismo no *Perna perna*. Entretanto, neste trabalho, o mecanismo apresentou taxas de efluxo muito próximas ao controle, apenas com uma leve tendência a indução, o que pode significar que todo o mecanismo de detoxificação celular esteja atuando de forma eficiente, não necessitando um aumento da atividade da Pgp. As concentrações de 15, 25, 33 e 50% são passíveis de se encontrar no ambiente, seja em caso de derramamento de petróleo ou de despejo de PAH's provenientes de indústrias. As outras concentrações (75 e 100%) não são

encontradas no ambiente devido à alta volatilidade do FSA, entretanto causaram uma grande inibição na taxa de efluxo da Pgp, corroborando a idéia anteriormente citada, onde a presença de contaminantes de forma geral causaria um aumento da taxa de efluxo, enquanto que em altas concentrações este contaminante especificamente causaria uma inibição neste mecanismo. Para se confirmar esta hipótese devem ser feitos ainda outros estudos, que determine mais precisamente a dose que estimula e que inibe a Pgp.

A partir dos dados obtidos nestes experimentos, foi selecionada uma concentração de cada contaminante, com os critérios de ser a menor concentração que tenha apresentado aparentemente efeito sobre a Pgp e que seja ao mesmo tempo realística. Estas concentrações foram 25 $\eta\text{g/L}$ para o TBT e de 33% para o FSA. Entretanto, como a escolha foi realizada antes dos testes estatísticos, as concentrações não foram condizentes com as estatisticamente diferentes.

Quando se manteve constante o FSA e variou as concentrações do TBT observou-se uma tendência à inibição do mecanismo, ainda que esta seja pouco acima do controle, a qual se manteve aproximadamente constante para todas as concentrações. Quando foi mantida a concentração do TBT constante e variadas as concentrações de FSA, a tendência à inibição também foi apresentada, entretanto de forma mais expressiva em relação ao controle. O TBT estaria agindo como um sensibilizador, pois o FSA estaria atuando mais sobre o mecanismo, apresentando uma tendência à inibição do mesmo nos dois bioensaios que os organismos foram contaminados por ambos xenobiontes. Não se pode dizer que o TBT é um “quimiosensibilizador”, pois este termo diz respeito a compostos não tóxicos, os quais atuam inibindo diretamente o mecanismo de resistência a multixenobióticos e conseqüentemente aumentando a concentração de outros tóxicos no interior da célula, favorecendo uma situação de maior toxicidade (KURELEC, 1992; KURELEC *et al.*, 1996). Com relação ao TBT, é mais provável que ele esteja atuando sobre outros mecanismos de detoxificação celular, permitindo assim que o FSA possa apresentar efeito total sobre o MXR.

Um dos mecanismos de detoxificação celular que pode estar envolvido neste processo é o citocromo P450, que diversos autores citam estar envolvido no metabolismo do FSA e é afetado tanto pelo FSA quanto pelo TBT. Segundo BARD *et al.* (2002) em seu estudo com o peixe *Anoploarctus purpureus*, os níveis de expressão da Pgp e do P450 estão altamente correlacionados e atuam em rotas distintas de detoxificação, sendo sistemas complementares. Vários componentes do petróleo e outros xenobióticos não identificados podem induzir concomitantemente estes mecanismos (BARD *et al.*, 2002). Alguns metabólitos do sistema P450 são efluxados pela Pgp e podem ser considerados indutores da síntese deste sistema.

O sistema P450 atua sobre o FSA metabolizando os PHA's que chegam à célula gerando subprodutos que podem ser potencialmente tóxicos para a célula, como é o caso do BaP-7,8-diol-9,10-epoxi, produto do metabolismo do BaP e que é um dos responsáveis pelo aparecimento de adutos no DNA, impossibilitando a transcrição onde ocorrem e tendo efeito cancerígeno (NISHIMOTO & VARNASI, 1985). Como a Pgp expulsa metabólitos do sistema P450, estes não causariam danos nas células, complementando o efeito do P450 e mantendo a célula saudável e com níveis de atividade da Pgp próxima aos controles, como é demonstrado pelos resultados obtidos quando os organismos foram contaminados com o FSA isoladamente.

É citado em literatura, entretanto, que o TBT inibe a ação do citocromo P450 (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; FENT, 1996) agindo antagonicamente diminuindo a metabolização do PAH's e favorecendo seu efeito direto sobre a Pgp. Assim, o FSA poderia estar agindo inibindo a atividade da Pgp, resultado apresentado neste trabalho. Entretanto, não foi encontrado em literatura nenhum dado que relacione o mecanismo de resistência a multixenobióticos com estes dois contaminantes, sendo necessários mais estudos para que estas hipóteses sejam corroboradas, analisando as taxas do P450 juntamente com os níveis e atividade da Pgp.

Em relação às análises realizadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), não foi encontrado em literatura dados sobre o efeito do FSA no

tecido branquial. Os resultados com metais pesados encontrados na literatura são destoantes dos observados neste trabalho, sendo geralmente relatadas fusão da lamela secundária, gradual degeneração das células e degeneração das mitocôndrias das células de cloreto quando contaminadas com TBT, entretanto os organismos utilizados foram peixes, o que pode refletir uma diferença intraespecífica de resposta (HOLM *et al.*, 1991). Com o mexilhão *Perna perna* foi encontrado apenas um trabalho que onde os organismos foram contaminados com mercúrio, encontrando-se como resultado desta exposição ausência de cílios em algumas áreas e aparecimento de áreas de necrose (GREGORY *et al.*, 1999). Entretanto, todos estes resultados foram encontrados após um maior tempo de exposição, o que pode explicar os nossos resultados terem efeitos não tão graves, porém que ainda assim podem comprometer a alimentação e a troca de gases destes organismos. Os cílios são os responsáveis pela circulação da água na brânquia e estando agrupados de diferentes formas não conseguem estabelecer um fluxo de água, além de impedir possíveis fluxos que se originem em regiões que não tenham apresentados danos. Possivelmente estas áreas dariam origem a áreas com ausência de cílios, como uma defesa do próprio organismo, ou até mesmo a áreas de necrose, pela falta de oxigenação das células. Mas para que se possam confirmar estes resultados são necessários estudos com um maior tempo de exposição aos contaminantes.

5. CONCLUSÃO

O efeito do TBT e do FSA sobre o mecanismo MXR ainda é um tema pouco explorado na ecotoxicologia apesar da relevância destes contaminantes. Estes dois xenobiontes apresentaram efeito sobre a Pgp direta ou indiretamente e mais estudos devem ser feitos para se desvendar a forma como estes e outros contaminantes atuam no metabolismo celular.

Os dados apresentados neste trabalho indicam um caminho para que se aprofunde o estudo deste mecanismo, através da utilização de outras técnicas e de mecanismos que possam se relacionar ao MXR na função de detoxificação celular, para que se possa desvendar a forma como as células se defendem contra os produtos tóxicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, P. D. 1989. **Water pollution biology**, Chichester, Ellis Howood.
- ACHARD, M.; BAUDRIMONT, M.; BOUDOU, A.; BOURDINEAUD, J. P. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. **Aquatic toxicology**, n. 67, p. 347-357.
- ANDERSON, J. W.; NEFF, J. M.; COX, B. A.; TATEM, H. E.; HIGHTOWER, G. M. 1974. Characteristics of dispersion and water-soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine biology**, v. 27, p. 75-88.
- AKAISHI, F. M. Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax sp.* Utilizando biomarcadores de contaminação. Curitiba, 2003. 141 p. Tese (Mestrado em Biologia Celular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.
- AMBUDKAR, S.; DEY, S.; HRYCYNA, C.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. 1999. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 39, p. 361-398.
- BARD, S. M.; WOODIN, B. R.; STEGEMAM, J. J. 2002. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpuresces*) exposed to environmental contaminants. **Aquatic Toxicology**, v. 60, p. 17-32.
- BAYNE, B. L. 1976. **Marine mussels: their ecology and physiology**. Cambridge: Cambridge Academic Press. 504 p.
- BEVERIDGE, T.J.; HUGLES, M. N.; LEE, H.; LEUNG, K.T.; POOLE, R. K.; SAVIVAUDIS, I.; SILVER, S.; TREVORS, J. T. 1997. Metal microbe interactions: contemporary approaches. **Advanced in microbial physiology**. n. 38, p.177-243.
- BRADLEY, G.; JURANKA, P.; LING, V. 1988. Mechanism of multidrug resistance. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 948, p. 87-128.
- BRAUNER, C. J.; BALLANTYNE, C. L.; VIJAYAN, M. M.; VAL, A. L. 1999. Crude oil exposure affects air breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air – breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 123, p. 127-134.
- CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**. V.247, p. 295-311.
- CHIN, K. V.; TANAKA, S.; DARLINGTON, G.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Heat shock and arsenite increase expression of multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n.1 p. 221-226.

EPEL, D. 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 120, p. 23-28.

EUFEMIA, N. A.; EPEL, D. 1998. The multixenobiotic defense mechanism in mussel is induced by substrates and non-substrates: implications for a general stress response. **Marine Environmental Research**. v. 46, n.1-5, p. 401-405.

FONTANA, J. D.; LANÇAS, F. M.; PASSOS, M.; CAPPELARO, E.; VILEGAS, J.; BARON, M.; NOSEDA, M.; POIHO, A. B.; VITALE, A.; WEBBER, A. C.; MAUL, A.A.; PERES, W. A.; FOERSTER, L. A. 1999. Selective polarity and adsorption-Guined extraction/purification of *Annona sp.* Polar Acetogenins and biological assay against agricultural pests. **App. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v. 70/72, p. 67-76. _

FRANCO, h. m. 1993. Santa Catarina é o maior produtor nacional de mexilhões. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.6, p. 45-48.

FENT, K. 1996. Ecotoxicology of Organotin Compounds, Critical Reviews in Toxicology, v. 26, n. 1, p. 1-117.

FERRARRO, M. V. M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: cometa, micronúcleo e de aberrações cromossômicas.** Curitiba, 2003. 94 p. Dissertação (mestrado em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GREGORY, M. A.; GEORGE, R. C.; MARSHALL, D. J.; ANADRAJ, A; MCCLURG, T. P. 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (*Mollusca: bivalvia*). **Marine Pollution Bulletin**, Great Britain, v.39, n. 1-12, p.116-121.

GOTTESMAN, M. M.; AMBUDKAR, S. V. 2001. Overview: ABC Transporters and Human Disease. **J. Bioenerg. Biomemb.**, New York, v. 33, n. 6, p. 453-458.

GROSSILING, B. F. 1976. **An estimate of the amounts of oil entering the oceans, in source, effects and sinks of hydrocarbons in the aquatic environment.** American Institute of Biological Sciences, Arlington, UA.

HEATH, A. G. 1995. **Water pollution and fish physiology.** 2 ed. Boca Raton: CRC.

HOLM, G; NORRGREN, L.; LINDÉN, O. 1991. Reproductive and histopathological effects of long-term experimental exposure to bis(tributyltin)oxide (TBTO) on three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus. **Journal of Fish Biology**, n. 38, p.373-386.

HORIO, M.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. 1988. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistance cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 3580-3584.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELAN, R. A.; OKIHIRO, M. S. 1992. Histopathologic biomarkers. In: **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress.** Lewis Publishers, p. 155-208.

- JULIANO, R. L.; LING, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 455, p. 152-162.
- KRAYBILL, H. F. 1976. **Distribution of chemical carcinogens in aquatic environment**. Prog. Exp. Tumor Res. N. 20, p. 30-34.
- KURELEC, B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 22, n. 1, p. 23-43.
- KURELEC, B.; LUCIC, D.; PIVCEVIC, B.; KRCA, S. 1995(b). Induction and reversion of multixenobiotic resistance in the marine snail *Monodonta turbinata*. **Mar. Biol.**, Berlin, v. 123, p. 305-312.
- KURELEC, B.; WALDMANN, P.; ZAHN, R. K. 1996(a). The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in a clam *Corbicula fluvinea*. **Marine Environmental Research**. V. 42, n.1-4, p. 383-387.
- KURELEC, B.; PIVCEVIC, B. 1996(b). Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. **Biochem. Biophys. Res. Sci. USA**, Washington, v.93, p. 5401-5406.
- KURELEC, B. 1997. A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. **Environ. Health Perspect.**, Tringle park, v.105 (Suppl. 4), p.855-860.
- KURELEC, B.; SMITAL, T.; BRITVIC, S.; PIVCEVIC, B.; KRCA, S.; JELASKA, S. B.; SAUERBORN, R.; MUSTAJBEGOVIC, S. 1997. Multixenobiotic defense mechanism in aquatic organisms. **Periodicum Biologorum**, Zagreb, v. 99, n. 3, p. 319-328.
- LEE, R. F.. 1996. Metabolism of tributyltin by aquatic organisms. *In*: M. A. Champ and P. F. Seligman, editors. **Organotin: Environmental Fate and Effects** London.: Chapman & Hall. p. 369-382.
- LINDQUIST, O. 1994. Atmospheric cycling of mercury: an overview. In "WATRAS, C. J. & HUCKABLL, J. W." Mercury Pollution Integration and Synthesis. London, Lewis Publishers.
- MACKAY, D.; SHIU, W. Y. 1976. Aqueous solubility of weathered northern crude oil. **Bulletin Environment Contamination Toxicology**, v. 15, p. 01-109.
- MELANCON, M. J. 1995. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In "HOFFMAN, D. J.; RATTNER, J. C.; BURTON, G. A. & CAIRNS, J (Eds.). Handbook of ecotoxicology. Boca Raton: LEWIS. P. 297-321.
- NEFF, H. M. 1978. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects**. Applied Science Publishers Ltd. Essex, UK.
- NISHIMOTO, M.; VARNASI, U. 1985. Benzo(a)pyrene metabolism and DNA adduct formation mediated by English sole liver enzymes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, p. 263-281.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H.; PELLETIER, E. 2002. Evaluation of Tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 51, p. 161-167.

PESSATI, M.L. Caracterização do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) no mexilhão *Perna perna*. Curitiba, 2002. 160 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

RABITTO, I. da S. Análise dos efeitos tóxicos do TBT (tributilestanho) e chumbo inorgânico (Pb II) em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1784) (traíra) após exposição trófica e subcrônica: aspectos morfológicos e neurotóxicos. Curitiba, 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.

SAEED, T.; MUTAIRI, M. A. 1999. Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of Leaded Gasolines in Seawater. **Environment International**, v. 25, p. 117-129.

SARKADI, B.; MÜLLER, M. 1997. Search for a specific inhibitors of multidrug resistance in cancer. **Seminars in Cancer Biol.**, London, v. 8, p. 171-182.

SMITAL, T.; KURELEC, B. 1998. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. **Mutation Research**. V. 399, p. 43-53.

STEPHENS, S. M.; ALKINDI, A. Y. A.; WARING, C. P.; BROWN, J. A. 1997. Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 953-964.

TONG, S. L.; PANG, F. Y.; PHANG, S. M.; LAI, H. C. 1996. Tributyltin distribution in the coastal environment of Peninsular Malaysia. **Environmental Pollution** v. 91, n. 2, p. 209-216.