
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DE *Mytella falcata* (MOLLUSCA, BIVALVIA) COMO
INDICADORA DE EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS NO
ESTUÁRIO DE SANTOS, SP.

JOSÉ AUGUSTO DE OLIVEIRA DAVID

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

RIO CLARO
Estado de São Paulo
Março/2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ESTUDO DE *Mytella falcata* (MOLLUSCA, BIVALVIA) COMO
INDICADORA DE EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS NO
ESTUÁRIO DE SANTOS, SP.**

JOSÉ AUGUSTO DE OLIVEIRA DAVID

Orientadora: Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**RIO CLARO
Estado de São Paulo
Março/2007**

594 David, José Augusto de Oliveira
D249e Estudo de *Mytella falcata* (Mollusca, Bivalvia) como
indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de
Santos, SP / José Augusto de Oliveira David. – Rio Claro :
[s.n.], 2007
205 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Sílvia Fontanetti Christofolletti

1. Molusco. 2. Ecotoxicologia. 3. Micronúcleo. 4. Ensaio
de cometa. 5. Histologia. 6. Microscopia eletrônica. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais
Magda Maria de Oliveira David e
Antonio de Almeida David, sempre
prontos para incentivar e apoiar minhas
decisões.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais, Magda e Antonio, e minhas irmãs, Maria Alice e Maria Elisa, que me apoiaram nos momentos de frustração e nas conquistas, além de contribuírem ativamente na execução deste trabalho, tanto nas coletas como nas discussões. A todos da minha família, sempre interessados no meu trabalho.

A Carmem, minha querida orientadora, que me guiou nos momentos didáticos, científicos e pessoais, durante quase oito anos de muitas discussões e entendimentos.

A Capes, pela bolsa concedida e meus colegas do programa de pós-graduação, sempre muito compreensivos e cordiais nas discussões sobre assuntos importantes, durante o tempo em que fui representante discente no conselho deste programa.

Ao Daniel da “Náutica da Ilha” e todo o pessoal da CETESB que foram importantíssimos nas coletas e no conhecimento do estuário de Santos.

Aos professores Ana Maria Costa Leonardo, Carminda da Cruz Landin, Denis Abessa, Gisela de Aragão Umbuzeiro, Juliana Silva, Lúcia Regina Ribeiro, Maria Aparecida Marin Morales e Maria Izabel Souza Camargo, que foram fundamentais nas discussões deste trabalho, trazendo informações e sugestões muito relevantes.

Aos meus colegas de laboratório e aos técnicos Antonio Yabuki, Gerson Mello, Monika Iamonte e Rogilene Prado, que me ajudaram nas técnicas empregadas aqui.

A todos os meus amigos da graduação, pós-graduação, da minha cidade e minha namorada, que sempre foram um ponto de apoio para os momentos difíceis, tantos os pessoais quanto os profissionais.

A Lucila, Neuza e Cristiane que sempre estiveram prontas para ajudar.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente da minha vida acadêmica.

ÍNDICE

	Página
1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introdução.....	5
4. Revisão de literatura.....	9
4.1. Caracterização da área de estudo.....	9
4.2. Organismo utilizados nos estudos.....	15
4.3. Genotoxicidade.....	17
4.4. Análise de micronúcleos.....	19
4.5. Ensaio do cometa.....	22
4.6. Histopatologia.....	26
5. Material e métodos.....	32
5.1. Material.....	32
5.2. Pontos de coleta.....	32
5.3. Análise de micronúcleos.....	33
5.4. Teste de sensibilidade de tecidos para o ensaio do cometa.....	34
5.5. Ensaio do cometa.....	34
5.6. Histopatologia.....	36
5.7. Método para detecção de proteínas totais – Azul de Bromofenol.....	37
5.8. Método para detecção de polissacarídeos – PAS.....	37
5.9. Microscopia eletrônica de varredura.....	38
5.10. Microscopia eletrônica de transmissão.....	38
5.11. Análise estatística.....	39
6. Tabela e Figuras.....	40
7. Resultados.....	46
7.1. Comparação do ensaio do cometa em diferentes tecidos de <i>Mytella falcata</i>	47
7.2. Brânquias do sururu <i>Mytella falcata</i> como indicadoras de genotoxicidade no estuário de Santos.....	65
7.3. Danos ao DNA em células da hemolinfa de <i>Mytella falcata</i> (Bivalvia) provenientes do estuário de Santos (Brasil).....	81
7.4. Surface morphology of <i>Mytella falcata</i> gill filaments from three regions of the Santos Estuary.....	106
7.5. Caracterização histológica, histoquímica e ultra-estrutural dos filamentos branquiais de <i>Mytella falcata</i> (Bivalvia).....	126
7.6. Histopatologia dos filamentos branquiais de <i>Mytella falcata</i> provenientes do estuário de Santos.....	148
7.7. O papel do muco na brânquias de <i>Mytella falcata</i> cronicamente expostos a ambientes poluídos.....	169
8. Considerações finais.....	189
9. Referências bibliográficas.....	193

1. RESUMO

O estuário de Santos já foi um exemplo de degradação ambiental, porém medidas dos órgãos responsáveis pelo saneamento ambiental resultaram em melhoria na qualidade das águas, mas os sedimentos e a biota continuam contaminados. Os moluscos bivalves são bons bioindicadores de poluição ambiental, devido a seu hábito sésil e filtrador, e à capacidade de acumular diversas substâncias. *Mytella falcata* é uma espécie comum em regiões tropicais, encontrada semi-enterrada no sedimento, podendo fornecer dados sobre as condições do mesmo. Neste trabalho, bivalves da espécie *Mytella falcata* residentes em três pontos do estuário de Santos com diferentes níveis substâncias potencialmente poluidoras, foram analisado a fim de caracterizar a população residente nestes pontos. As técnicas utilizadas foram o ensaio do cometa, o teste do micronúcleo e a análise histopatológica das brânquias, incluindo técnicas histoquímicas, ultramorfológica e ultra-estrutural. As análises demonstraram que a espécie pode ser para avaliar danos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos. Utilizando o ensaio do cometa os indivíduos dos pontos B e C mostraram níveis significativamente maiores de danos ao DNA quando comparados aos animais do ponto A. Quanto a análise dos micronúcleos os animais de todos os pontos apresentaram resposta muito semelhante. A morfologia dos filamentos branquiais desta espécie mostrou-se muito

similares a de espécies próximas e na análise histopatológica foram observadas alterações nos pontos B e C; as principais foram o desprendimento do epitélio da região lateral do filamento, modificação na morfologia deste epitélio, aumento na produção de muco e processos envolvidos na eliminação de células e renovação das mesmas. Os dados obtidos mostraram que todas as técnicas resultaram no diagnóstico de que os animais residentes no ponto A apresentaram as menores taxas de alterações para todas as análises, enquanto os animais dos outros dois pontos mostraram níveis significativamente maiores. Estas alterações foram consideradas como formas de adaptação ao ambiente poluído a fim de evitar a entrada de poluentes, ou mesmo de eliminar células prejudicadas ou poluentes ingeridos. A semelhança da resposta dos animais dos pontos B e C foi relacionada com a maneira como os indivíduos lidam com o sedimento. Desta forma, este trabalho confirma que os sedimentos são grandes depósitos de poluentes e alerta as autoridades responsáveis para a periculosidade de processos de manuseio dos sedimentos, como a dragagem de regiões portuárias. Ressalta também, que animais residentes expostos cronicamente a poluentes podem sofrer certas alterações a fim de evitar danos capazes de prejudicar sua sobrevivência.

2. ABSTRACT

The Santos estuary which is located in São Paulo, Brazil, was considered one of the major examples of coastal degradation. Nowadays the quality of this environment has improved, but the sediment and the biota are still contaminated. Bivalve mollusks are sedentary, filter-feeding invertebrates that have been widely used to monitor aquatic habitats. *Mytella falcata* is very common in tropical areas and lives buried in the sediment. In this study, the mussel *Mytella falcata*, from three sites of Santos estuary, were analyzed; the three sites presented different levels of harmful substances. The aim of this analysis was to characterize the animals that live in this area. The techniques applied were the comet assay, micronucleus test and histopathological analysis of the gill filaments, including the histochemistry and scanning and transmission electron microscopy. Laboratory tests demonstrated that the species can be used as bioindicator. The analyzed specimens from sites B and C, showed higher levels of DNA damage when compared to those from site A. The micronucleus test presented no difference between the three sites. *Mytella falcata* gill filaments showed high similarity to other Mytilidae species. The histopathological analysis demonstrated some alterations in sites B and C. The major alterations were the detachment of epithelial cells from the lateral surface, changes in the morphology of this epithelium, increase in mucous production

and processes involved in cell elimination and renovation. The damages found in animals from sites B and C were considered as adaptations to the exposition to pollutants. The lack of difference between animals from sites B and C were related with the distance between animals and sediment. In conclusion, this study confirm that sediments act as a deposition site for pollutants and alert the authorities for the manner of dealing with this sediment. Other point highlighted in this study is that animals chronically exposed to pollutants can suffer adaptations in order to avoid higher damages.

3. INTRODUÇÃO

O grande desenvolvimento industrial ocorrido no século XX trouxe inúmeros benefícios para o ser humano, mas, ao mesmo tempo, ocasionou grande degradação das condições ambientais, isto porque a maioria dos processos industriais resulta na formação de resíduos que, direta ou indiretamente, alcançam os recursos hídricos, prejudicando sua qualidade tanto para a manutenção da biodiversidade quanto para o ser humano.

O estuário de Santos começou a receber aportes de efluentes industriais no início do século XX e a partir daí a industrialização da região cresceu cada vez mais, assim como o lançamento de substâncias tóxicas no ambiente. Além das indústrias, outras fontes de poluição como depósitos de lixo, esgoto doméstico e o trânsito do Porto de Santos, também contribuíram para a degradação deste estuário. Nos anos 70, esta região foi considerada um exemplo de degradação ambiental, e apesar de serem tomadas uma série de medidas para reverter este quadro, ainda são detectados altos níveis de poluentes nos sedimentos de certas localidades do estuário (UMBUZEIRO et al., 2006).

A ecotoxicologia aquática estuda os efeitos adversos de substâncias químicas manufaturadas e de outros materiais, antropogênicos ou naturais, em organismos

aquáticos. Os efeitos adversos dessas substâncias em diferentes organismos incluem efeitos letais a curto e longo prazo, e efeitos subletais, tais como mudança de comportamento, alterações do crescimento, da reprodução, da tomada de alimento e outros (SOUSA, 2002).

Uma série de ferramentas foi desenvolvida a fim de avaliar alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas e comportamentais resultantes da exposição a substâncias danosas aos organismos vivos coletados em campo ou expostos em laboratório.

A análise das células micronucleadas é uma dessas ferramentas que pode ser empregada em uma variedade de tecidos e detecta a presença de fragmentos ou cromossomos inteiros perdidos durante a mitose, que assumem a morfologia de um micronúcleo na interfase seguinte (DIXON e WILSON, 2000).

A detecção de quebras no DNA através do ensaio do cometa analisa núcleos celulares isolados submetidos à uma solução alcalina para relaxamento do DNA. Estes núcleos, chamados agora de nucleóides, passam por uma eletroforese na qual os fragmentos de DNA migram assumindo o aspecto de um cometa, sendo que o tamanho da cauda do cometa reflete a extensão do dano ao DNA.

A detecção de alterações morfológicas com técnicas de histopatologia pode ser utilizada em diversos tecidos e analisa, principalmente, a exposição a estressores subletais; este tipo de análise detecta efeitos irritantes, especialmente aqueles considerados crônicos (BERNET et al., 1999).

Dentre os organismos utilizados como bioindicadores, os bivalves têm se destacado nas últimas décadas; muitos deles apresentam hábito sésil e filtrador, o que é

altamente desejado em estudos de bioacumulação de poluentes orgânicos e de metais (RITTSCHOF e McCLELLAN-GREEN, 2005).

Segundo Nicholson e Lam (2005), a maioria dos estudos de biomonitoramento com mexilhões marinhos foi desenvolvido em regiões temperadas, utilizando espécies do gênero *Mytilus*, sendo poucos os estudos conduzidos em espécies de regiões tropicais e subtropicais. Recentemente, o mexilhão *Perna viridis* vem sendo utilizado como bioindicador ao longo da região dos Oceanos Índico e Pacífico, mostrando alto potencial para ser utilizado em estudos de monitoramento ao longo dos locais onde vive. Estes autores enumeraram uma série de biomarcadores que foram aplicados com sucesso nesta espécie, dentre eles, marcadores moleculares, citológicos, histológicos e fisiológicos, o que mostra a versatilidade e amplitude de informações que os bivalves podem fornecer.

Também em zonas tropicais do Hemisfério Sul foi iniciada, recentemente, uma série de testes utilizando *Perna perna*, outro Mytilidae do gênero *Perna*, sendo realizados estudos de histopatologia nas brânquias de animais expostos a poluentes e de animais provenientes de localidades poluídas (GREGORY et al., 1999, GREGORY e GEORGE, 2000, GREGORY et al., 2002).

O sururu *Mytella falcata*, é um bivalve amplamente distribuído na América Latina encontrado no do litoral Atlântico e do Pacífico (NARCHI e GALVÃO-BUENO, 1983). É amplamente consumido no nordeste brasileiro, muitas vezes sendo a única fonte de proteína de alguns povoados mais pobres (BOFFI, 1979). A espécie vive semi-enterrada em regiões estuarinas e, por isso, é de grande interesse em estudos de biomonitoramento, fornecendo dados sobre as condições do sedimento (NARCHI e GALVÃO-BUENO, 1983).

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi analisar o sururu, *Mytella falcata*, residente no estuário de Santos, a fim de avaliar como os animais estão respondendo às condições ambientais a que estão submetidos, uma vez que este estuário apresenta altos níveis de contaminação do sedimento. Os objetivos específicos foram: 1) analisar se esta espécie é uma boa indicadora através da exposição, em laboratório, dos animais do ponto menos impactado (ponto A) a uma substância alquilante e posterior análise das quebras no DNA através do ensaio do cometa; 2) analisar as quebras no DNA e a formação de micronúcleos, nos animais coletados nos três pontos amostrais, a fim de comparar os níveis de dano encontrados e o grau de contaminação destes pontos; 3) descrever a morfologia das brânquias desta espécie e esclarecer a função dos diferentes tipos celulares deste órgão; 4) comparar a morfologia das brânquias dos animais dos três pontos amostrados a fim de comparar as alterações encontradas com o grau de contaminação destes pontos; 5) analisar o número de células mucosas nos filamentos branquiais dos animais coletados nos três pontos amostrados, a fim de identificar uma ferramenta para análise ambiental.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Caracterização da área de estudo

A Baixada Santista está localizada na porção central do litoral do Estado de São Paulo, entre as escarpas da Serra do Mar e o Oceano Atlântico. Segundo Martins (2005), do ponto de vista topográfico, a região pode ser dividida em dois compartimentos distintos. O primeiro compartimento, chamado Serra do Mar, corresponde a um conjunto de morros isolados, recobertos por árvores altas (18-20m de altura) características de Mata Atlântica; nesta região estão presentes vales em forma de “V”, profundamente entalhados, que condicionam a drenagem que escoar na região, formando núcleos exportadores dos materiais terrígenos que chegam à planície costeira santista. O segundo compartimento, chamado Baixada Litorânea, apresenta relevo de terrenos baixos, predominante planos, com baixa densidade de drenagem e padrão meandrante. Abriga comunidades vegetais de restinga e floresta tropical de planície litorânea, caracterizada por arbustos e árvores perenes.

Ao longo do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, notam-se vastas extensões de manguezais estabelecidos sobre um solo lamo-arenoso, atuando como filtro biológico e elo entre o estuário e o ecossistema marinho. Este tipo de vegetação

apresenta extrema importância, pois cobre cerca de 100km², excluindo-se as zonas devastadas (MARTINS, 2005).

Esta região apresenta clima tropical quente e úmido, sem estação seca definida, e temperatura média anual superior a 20°C. A pluviosidade é elevada, geralmente entre 2000 e 3000mm anuais, enquanto a umidade relativa média do ar é próxima de 85% (ABESSA, 2002). A drenagem de água doce para o Estuário Santista se dá por uma vasta rede de rios que nascem nas vertentes da Serra do Mar e correm para a planície da Baixada e rios mais curtos, de menor vazão. Na planície costeira, o conjunto de rios se ramifica em um complexo sistema de canais de maré que, junto com os braços de mar, forma inúmeras ilhas estuarinas, delimitando as ilhas de São Vicente e Santo Amaro (BONETTI, 2000). Devido ao fato de oferecerem proteção e alimento em abundância, estes canais estuarinos podem ser considerados como berçário para uma série de animais e são amplamente utilizados para pesca profissional e recreativa dos moradores da região e de turistas. Além disso, a coleta de mexilhões e crustáceos no estuário, tanto para consumo próprio como para venda, é uma prática comum na região.

O Brasil apresenta cerca de 7400 km de região costeira, abrangendo uma série de ecossistemas com condições específicas. Os manguezais são considerados áreas de preservação permanente; as raízes das árvores, neste ecossistema, prendem e estabilizam o sedimento e fornecem substrato para algas, esponjas e moluscos, que, por sua vez, atraem peixes e crustáceos em busca de alimento. Os detritos das folhas e microrganismos associados formam a base da cadeia alimentar nos mangues, além de servirem de alimento quando transportados para águas adjacentes mais profundas (PRÓSPERI e NASCIMENTO, 2006).

Os manguezais são ecossistemas que apresentam características particulares, principalmente devido à mistura de águas marinha e fluvial e à inundações frequentes a que são submetidos pelas marés. Tais fatores impõem variações extremas de pH ao ecossistema, além de proporcionarem condições permanentemente redutoras para os sedimentos e águas intersticiais. Nesses ambientes, a precipitação de metais é favorecida pelo alto pH e pela disponibilidade de sulfetos, devido às condições de redução na camada subsuperficial do sedimento (MASUTTI et al., 2002).

A ocupação humana da região da Baixada Santista iniciou-se em 1532, com a fundação da Vila de São Vicente. Em 1892 foi inaugurado o Porto de Santos, que tinha a função de escoar a produção de café para o exterior. Um curtume, implantado em 1895, foi o único empreendimento industrial do alto estuário, anteriormente ao ano de 1918, quando ocorreu a instalação de uma fábrica de papel e nos anos 20 com a construção de uma hidrelétrica a “Usina Henry Borden”, iniciou-se o processo de industrialização da Baixada Santista (MARTINS, 2005).

A construção da rodovia “Via Anchieta”, concluída em 1947, aumentou o fluxo turístico e de serviços na região. Na década seguinte as redes rodoviárias e ferroviárias interligadas a um terminal marítimo e a possibilidade de construção de ancoradouros no interior do estuário foram fatores preponderantes para a instalação das primeiras indústrias da região do Estuário Santista. Além disso, a proximidade com um grande centro consumidor em franca expansão (a cidade de São Paulo), a disponibilidade de água doce proveniente dos rios, e a presença de uma usina geradora de energia, também contribuíram para o desenvolvimento industrial (MARTINS, 2005).

Estas características permitiram a instalação de indústria de grande porte, como a Refinaria Presidente Bernardes e a Alba – Indústria Química no ano de 1955 e de um

pólo petroquímico, representado pelas indústrias: Companhia Brasileira de Estireno, Union Carbide do Brasil S.A., Petroquisa, Carbocloro, entre outras, durante a década de 50, e a criação de um complexo siderúrgico, em 1965, com a inauguração da Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA).

Segundo Martins (2005) o crescimento nas décadas de 50 e 60 implicou não apenas na ampliação da área portuária, mas também na necessidade de dragagens contínuas do leito do estuário, a fim de possibilitar o acesso de embarcações de alta tonelagem ao porto, como também as regiões do alto estuário onde foram construídos cais exclusivos para a indústria siderúrgica.

Na década de 70, o turismo foi fortemente impulsionado com a inauguração da Rodovia dos Imigrantes, levando à ocupação quase total das áreas baixas dos principais municípios da Baixada Santista. Aliado a esse crescimento, seguiu-se uma ocupação secundária de modo desordenado em áreas pouco privilegiadas como as margens dos canais estuarinos, mangues aterrados e áreas de encostas, contribuindo para agravar os problemas já existentes de uso e ocupação do solo da região (ABESSA, 2002).

Na década de 70, iniciou-se a deposição de resíduos sólidos gerados no município de Santos, no bairro do Alemoa. O descarte de lixo a céu aberto durante os anos subsequentes transformou a região, tornando o antigo bairro do Alemoa em um lixão. Em 2002, uma decisão judicial proibiu o descarte de lixo na região, entretanto em 2003 o lixão foi novamente reativado pela Prefeitura de Santos.

A inexistência de legislações específicas para a área ambiental, a falta de tecnologia para o controle de emissões das fontes poluidoras, o desconhecimento dos danos à natureza e pouco acesso a região da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) (criada em 1976), levaram a uma

situação de poluição generalizada nos diversos compartimentos dos ecossistemas locais, sendo a cidade de Cubatão a considerada como uma das mais poluídas do mundo.

A instalação do pólo petroquímico num vale ao pé da Serra do Mar mostrou-se um erro de planejamento. Os morros com cerca de 700m de altura, o clima quente e úmido, o regime de ventos e a topografia da impediam a dispersão de poluentes. A crise ambiental da região resultou na degradação da qualidade das águas das praias e conseqüente desvalorização imobiliária, além de afetar o ramo econômico dependente do turismo.

Os efeitos deletérios da poluição começara a ser revertidos a partir de 1984, quando se iniciou um intensivo programa de controle de poluição do ar, das águas e do solo, no Pólo Industrial de Cubatão. Entre as medidas deste programa, destacou-se a implantação de sistemas de tratamento de efluentes industriais em todas as indústrias da região, resultando em diminuição da carga de poluentes para o sistema hídrico (CETESB, 2001). Mas apesar do grande esforço para o controle da poluição e melhoria da qualidade ambiental, um levantamento realizado em 1988 concluiu que a região permanecia impactada devido às elevadas concentrações de metais pesados e compostos organoclorados presentes na água, nos sedimentos e organismos aquáticos (CETESB, 1990)

Durante a década de 90, deu-se continuidade à implantação e aperfeiçoamento do controle da poluição das águas e do solo na região; mas embora tenha ocorrido uma sensível melhora na qualidade da água, uma recuperação substancial dos manguezais e o aumento da diversidade de aves aquáticas, levantamentos recentes (1997 e 1998) apontam a persistência de problemas de acumulação de poluentes nos sedimentos, que são potencialmente disponíveis à biota aquática (CETESB, 2001).

Nishigima et al. (2001) trouxeram informações sobre o grau de contaminação por óleo e outros contribuintes biogênicos na região; a partir das análises da quantidade de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos nos sedimentos, os autores chegaram à conclusão de que os pontos amostrados mais próximos ao pólo industrial apresentavam maior concentração de hidrocarbonetos, demonstrando que esta característica é típica de sedimentos que receberam óleo de refinarias e atividades industriais.

Silva et al. (2003) e Umbuzeiro et al. (2004) realizaram estudos sobre o estuário de Santos com a finalidade de identificar fungos e bactérias associados ao sedimento, que poderiam biotransformar os poluentes presentes, degradando estes poluentes ou, até mesmo, tornando-os disponíveis para outros organismos, nos quais poderiam causar vários tipos de danos.

Umbuzeiro et al. (2006) analisaram nove pontos no estuário de Santos e detectaram atividade mutagênica através do teste de Ames, em amostras de água filtrada e de sólidos suspensos em apenas três destes pontos. Os autores concluíram que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) podem não ser os responsáveis pelos efeitos mutagênicos encontrados, mas sim subprodutos da sua transformação.

Kummrow et al. (2006) aplicaram a técnica do “blue rayon” associado ao teste com *Salmonella*, a fim de detectar a genotoxicidade de compostos policíclicos no estuário de Santos e concluíram que as águas deste sistema apresentam substâncias da classe dos nitrocompostos e amins aromáticas que podem ser responsabilizadas pelo efeito mutagênico encontrado.

Várias substâncias tóxicas são lançadas no sistema estuarino da Baixada Santista, tais como: metais, compostos orgânicos, hidrocarbonetos de petróleo e outros

que, por sua complexidade, requerem estudos científicos mais detalhados da região (BRAGA et al., 2000).

Segundo Martins (2005), atualmente, as principais fontes de contaminação do Estuário de Santos e São Vicente são: o Porto de Santos, o Pólo Industrial de Cubatão, os lixões e os despejos de esgoto, que ocorrem de forma clandestina por meio de canais e valas irregulares. Sendo que as indústrias contribuem com a maior quantidade de elementos e substâncias químicas para o estuário. A regi comporta hoje, cerca de 1110 indústrias de diferentes ramos de atividades (petroquímicas, siderúrgicas e de fertilizantes), descarregando cerca de 100.000 kg/mês de vários poluentes, como metais e derivados do petróleo.

4.2. Organismo teste

Os bivalves são amplamente utilizados como animais testes para estudos toxicológicos, pois são, em sua maioria, animais filtradores, que ao realizarem a filtração da água, entram em contato também com substâncias que estão presentes no meio, sendo algumas destas prejudiciais aos indivíduos.

Moluscos bivalves da família Mytilidae possuem vantagens nos estudos ecotoxicológicos por serem sésseis, fixando-se nas rochas e no substrato através do bisso, formando densos bancos naturais expostos ao ambiente e submetendo-se a suas variações de marés e salinidade (BOFFI, 1979; ZARONI, 2002).

Rittschof e McClellan-Green (2005) discutiram a utilização de moluscos como modelos multidisciplinares em estudos de toxicologia ambiental, e destacaram que a natureza sedentária de muitos bivalves adultos e o fato destes serem bem estudados e sensíveis a poluentes resultou no desenvolvimento de programas nacionais como o

conhecido pelo nome de “Mussel Watch”, que utiliza os bivalves para avaliar a qualidade do ambiente.

Gregory et al. (2002) ressaltam que na África do Sul nunca foi formalmente adotado um programa como o “Mussel Watch”, mas afirma que os conceitos de tal programa já estão sendo empregados, uma vez que os mexilhões da espécie *Perna perna* são utilizados em programas de análise ambiental na região.

A maioria dos estudos utilizando bivalves como bioindicadores foram realizados em regiões temperadas como a Europa e América do Norte, dando principal atenção às espécies locais como *Mytilus californianus*, *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* (GREGORY et al., 2002).

Por outro lado, existe um crescente interesse neste tipo de análise nos países de zonas tropicais e subtropicais, onde estas espécies não existem. Desta forma, uma série de outros organismos-teste têm sido utilizados como os bivalves marinhos *Perna perna* (GREGORY et al., 1999, BAINY et al., 2000; GREGORY e GEORGE, 2000, GREGORY et al., 2002, ABESSA et al., 2005) e *Perna viridis* (NICHOLSON e LAM, 2005) e os bivalves de água doce como *Limnoperna fortunei* (VILLELA et al., 2006) e *Corbicula fluminea* (RIGONATO et al., 2005).

O gênero *Mytella* é de grande interesse em estudos de biomonitoramento, pois é encontrado semi-enterrado em regiões estuarinas, fornecendo dados sobre as condições do substrato (NARCHI e GALVÃO-BUENO, 1983). A espécie *Mytella falcata* é nativa da América Latina e possui uma grande distribuição, sendo encontrada desde o litoral Atlântico da Venezuela até a Argentina e também na costa do Pacífico e Ilhas Galápagos (NARCHI e GALVÃO-BUENO, 1983). Considerado de grande importância alimentar, o sururu, é amplamente consumido em várias regiões do nordeste brasileiro,

muitas vezes sendo a única fonte de proteína de alguns povoados mais pobres (BOFFI, 1979).

Buchet et al. (1994) realizaram um estudo no qual serviram, para voluntários, peixes e mexilhões contendo altas concentrações ($>1500\mu\text{g}/\text{kg}$) de compostos arsênicos e relacionaram o consumo com a excreção de arsênico inorgânico. Os autores observaram que apenas o consumo de mexilhões resultou na eliminação de arsênico inorgânico, e justificaram a realização de estudos mais detalhados relacionando o risco de contaminação com o consumo de mexilhões contaminados.

No estuário de Santos, o sururu ou marisco, como é conhecido popularmente, está exposto às substâncias presentes nos sedimentos da região, sendo que estes podem ser acumulados nos tecidos dos animais. Os moradores da região, têm o hábito de coletar os animais para consumo ou venda dos mesmos, uma vez que estes são encontrados facilmente por todo o estuário, formando grandes bancos no substrato.

4.3. Genotoxicidade

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA alterando sua estrutura ou função, e quando essas alterações se fixam de forma a poderem ser transmitidas, denominam-se mutações. As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto aos indivíduos como a seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e do local onde ocorrem, e alterar o balanço dos ecossistemas. Nas populações, podem aumentar a incidência de câncer, doenças hereditárias, do desenvolvimento, neurocomportamentais e cardíacas, aumentar a

virulência de patógenos, bem como ter efeitos negativos sobre a biodiversidade (UMBUZEIRO e ROUBICEK, 2006).

Diferente dos estudos de genotoxicidade com orientação médica, nos quais o ponto chave é o indivíduo, os estudos com fins ecológicos lidam com os efeitos dos poluentes no material genético de populações naturais de animais, plantas, fungos e microrganismos (DEPLEDGE, 1998).

Anderson et al. (1994) definem ecotoxicologia genética como o estudo de mudanças induzidas por agentes químicos ou radioativos no material genético da biota natural, sendo que estas mudanças podem ser alterações diretas nos genes e na expressão gênica ou efeitos seletivos dos poluentes na frequência gênica. Os autores sugerem que as alterações no material genético também podem aumentar a diversidade genética, com mutações mantidas e outras que não persistem nas gerações subseqüentes.

O crescente interesse em estudos nesta área permitiu o desenvolvimento de inúmeras técnicas de observação dos efeitos de várias substâncias poluentes em diversos organismos-teste. Porém, apesar de diferentes estudos relacionando a toxicologia e a presença de poluentes na região de Santos, são raros os trabalhos envolvendo organismos residentes, principalmente em relação a estudos genotóxicos.

Nigro et al. (2006) estudaram uma série de biomarcadores para monitorar uma região estuarina na Itália, comparando mexilhões nativos e transplantados. Os autores detectaram que, enquanto biomarcadores altamente sensíveis (como o ensaio do cometa e o teste de retenção do vermelho neutro) fornecem resultados semelhantes nos animais residentes e nos transplantados, os biomarcadores que refletem os produtos de eventos cumulativos (como os micronúcleos) têm uma melhor capacidade discriminativa quando aplicados em animais expostos cronicamente (residentes). Por outro lado,

Abessa et al. (2005) observaram que *Perna perna* transplantados para pontos mais impactados apresentaram diminuição na retenção do vermelho neutro enquanto os animais residentes da mesma região não mostraram a mesma resposta, evidenciando que maiores estudos devem ser realizados antes de ser estabelecida uma regra entre o transplante de animais e a análise de animais residentes.

4.4. Análise de micronúcleos

Atualmente, existe uma infinidade de metodologias utilizadas para identificação de danos causados aos organismos expostos a poluentes presentes no meio. Segundo Dixon e Wilson (2000), podemos dividir as técnicas para detectar os danos ao material genético causados pela poluição ambiental em: 1) as que são visíveis na observação dos cromossomos e 2) as com efeito nos genes sem manifestação nos cromossomos. Porém, os autores afirmam que esta é uma classificação artificial, já que os cromossomos são a manifestação física da replicação do DNA e que as anormalidades cromossômicas estruturais são o resultado de danos ao DNA. Os autores comentam ainda que, quanto a molécula de DNA, os invertebrados marinhos expressam os danos induzidos por substâncias químicas de forma muito similar ao registrado para os organismos superiores.

Os danos clastogênicos são aqueles que danificam o cromossomo, ocasionando quebras cromossômicas. Uma forma de analisar os danos clastogênicos é a análise de micronúcleos, ligada à presença de fragmentos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante a mitose. Estes fragmentos ou cromossomos perdidos entram no citoplasma onde assumem a forma de um pequeno núcleo ou micronúcleo na intérfase seguinte (DIXON e WILSON, 2000).

Para estimar a sensibilidade do teste de micronúcleo, Scarpatto et al. (1990), expuseram, por 48 horas em laboratório, bivalves da espécie *Mytilus edulis* a dois compostos sabidamente mutagênicos: vincristine (VCR) e benzo(a)pireno (BaP) em concentrações diferentes. Após detectar, para os dois compostos analisados, aumento significativo no número de células micronucleadas, os autores transferiram animais criados em águas limpas (ponto de referência) para regiões conhecidamente poluídas. Os animais foram então coletados semanalmente para análise das células micronucleadas. Os autores observaram que a frequência de micronúcleos nos animais expostos foi significativamente maior do que no ponto de referência.

Segundo Burgeot et al. (1996), os bivalves provaram ser organismos interessantes para estudos do efeito mutagênico de poluentes, por meio da análise dos micronúcleos, porém os autores questionam a aplicação rotineira deste teste em bivalves para inspeção de poluição *in situ*. Este questionamento se deu, porque os autores encontraram uma alta variabilidade no número de micronúcleos observados em *Mytilus galloprovincialis* coletados no litoral da França, sendo que esta variabilidade não permitiu uma comparação entre os pontos amostrados.

Izquierdo et al. (2003) sugeriram que, para avaliar a sensibilidade do teste, os animais devem ser coletados a distâncias regulares da fonte poluidora. Para realizar tal experimento, os autores analisaram exemplares de *Mytilus edulis* coletados a diferentes distâncias de River Piles no norte da Espanha e de Puerto Madry na Argentina, localidades que apresentam baixos níveis de poluição urbana. Além disso, os autores transplantaram animais desta espécie para perto de um lançamento de efluente industrial, também colocando-os a diferentes distâncias da fonte poluidora. Ao observarem que o aumento no número de micronúcleos está altamente relacionado com

a proximidade das fontes poluidoras, os autores recomendaram a utilização da análise de micronúcleos e da espécie em estudos de biomonitoramento.

Mersch et al. (1996) expuseram o bivalve *Dreissena polymorpha* à uma série de compostos clastogênicos em condições laboratoriais e observaram a formação de micronúcleos nos hemócitos e nas células branquiais dos mesmos. Os resultados mostraram que a hemolinfa é um tecido mais adequado para estudos ambientais, uma vez que é facilmente obtida, apresenta micronúcleos mais evidentes, possui menores níveis basais.

Mersch e Beauvais (1997) transplantaram indivíduos de *Dreissena polymorpha* para seis pontos que recebem efluentes industriais e suspeitos de apresentarem agentes químicos genotóxicos. Os animais foram mantidos nestes pontos por dois meses, para posterior análise das células micronucleadas; estas foram encontradas entre 5 e 8,8%, sendo este valor considerado significativamente maior que a taxa basal encontrada para a espécie. Os autores sugeriram que a técnica de transplante, juntamente com a análise de células micronucleadas poderia ser utilizada como padrão em estudos de água doce.

Pavlica et al. (2000) estudaram a resposta de dois moluscos, o mexilhão de água doce *Dreissena polymorpha* e o caracol *Planorbis corneus*, expostos até 14 dias ao pentaclorofenol. Os hemócitos dos dois moluscos foram analisados observando-se a frequência de células micronucleadas. Neste trabalho foi detectada a taxa de formação espontânea de micronúcleos, sendo que nos mexilhões da espécie analisada esta se encontra entre 0,5 e 2,75‰ e para os caracóis está entre 1,56 e 2,00‰, o que demonstra que os mexilhões apresentam uma maior variação nos níveis de formação espontânea de micronúcleos. Os autores observaram também aumento significativo de micronúcleos

nos animais tratados com pentaclorofenol e sugeriram que a hemolinfa das duas espécies representa um tecido apropriado para detectar genotoxicidade ambiental.

Carvalho Pinto-Silva et al. (2003) utilizaram o teste do micronúcleo para avaliar bivalves da espécie *Perna perna* expostos, em laboratório, ao ácido okadaico, uma toxina que pode ser acumulada em animais filtradores de consumo humano e que também é capaz de induzir modificações no DNA. Os autores observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos animais expostos quando comparados com o grupo controle.

Também em estudo realizado em laboratório, Siu et al. (2004), expuseram o bivalve *Perna viridis*, a diferentes concentrações de benzo(a)pireno por até 12 dias. Os autores realizaram a análise dos hemócitos micronucleados dos indivíduos expostos e observaram resposta de acordo com a concentração do composto analisado, bem como quanto ao tempo de exposição.

Barsiene et al. (2004) analisaram a frequência de micronúcleos em peixes (*Platichthys flesus* e *Symphodus melops*) e no mexilhão *Mytilus edulis* e observaram que, apesar de ambos apresentarem respostas semelhantes em relação ao grau de contaminação dos pontos amostrados, os mexilhões apresentaram maior frequência de células com micronúcleos. Os autores discutiram os resultados e ressaltaram a importância de se considerar fatores como idade, sexo, estação do ano, temperatura e quantidade de oxigênio disponível, na formação de micronúcleos.

4.5. Ensaio do cometa

O ensaio de cometa é relativamente simples de ser realizado. Nele, núcleos celulares isolados, previamente expostos *in vitro* ou *in vivo* a mutágenos, são suspensos

num “sanduíche” de agarose em uma lâmina e então, suas membranas são lisadas com detergente, seguindo por um tratamento com solução alcalina forte para extração das proteínas nucleares, levando a um relaxamento e desenovelamento do DNA. Os nucleóides passam então por uma micro-eletroforese numa cuba horizontal, onde qualquer fragmento de DNA (que é carregado negativamente) migra em direção ao ânodo. Após coloração qualquer quebra na fita de DNA é observado como uma “cauda de cometa”.

Steinert (1996) utilizou o ensaio do cometa para detectar danos ao DNA em hemócitos de *Mytilus edulis* e comparar estes resultados com as características do DNA de células apoptóticas, já que uma das características da apoptose é a indução de nucleases endógenas que resultam na fragmentação do DNA. Para isso, os hemócitos desta espécie foram expostos ao cobre, benzo(a)pireno e luz UV; além disso, uma duplicata foi feita com células pré-tratadas com cicloeximida, substância capaz de inibir a apoptose por inibir a síntese de proteínas. O autor concluiu que estresse não genotóxico pode induzir fragmentação típica de apoptose, e que este teste pode ser utilizado como ferramenta para detecção de estresse genotóxico e citotóxico, que levaria à apoptose.

Mitchelmore e Chipman (1998) fizeram uma revisão de trabalhos utilizando o ensaio do cometa com diferentes organismos aquáticos. Neste artigo, os autores discutem as vantagens e desvantagens da utilização deste teste, comparando-o a outras técnicas para detecção de quebras na fita de DNA, além de discutir a aplicabilidade do teste em estudos de monitoramento ambiental. Os autores concluíram que este teste deve ser utilizado com muita atenção, para que não ocorram erros de interpretação, e

ainda, que o teste merece estudos para detecção de variabilidade entre indivíduos e células expostos a poluentes e estímulos genotóxicos naturais.

Hamoutene et al. (2002) estudaram hemócitos e células da glândula digestiva de *Mytilus edulis* e *Mya arenaria* expostos a diluições de óleo cru. Os autores relataram que não ocorreu variação entre indivíduos de sexos diferentes nas duas espécies, porém, apenas em *Mytilus edulis* foi observado um aumento significativo nos valores de comprimento da cauda nos cometas de células da glândula digestiva; discutiram também, que a diferença encontrada entre as espécies pode ser relacionada a diferentes taxas de filtração, de reparo de DNA e de desintoxicação.

Large et al. (2002) aplicaram o ensaio de cometa em *Mytilus edulis* coletados em um local com altas concentrações de HPAs e os compararam com animais de um ponto de referência; os autores observaram que não havia diferenças entre os resultados das duas áreas. Realizaram também um ensaio em laboratório, fornecendo alimento contaminado com benzo(a)pireno para os animais; observaram um aumento de quebras na fita de DNA nos primeiros dias do teste, mas no 14º dia de exposição à alimentação contaminada foi observado um grande declínio nos danos, indicando que quando estes moluscos são expostos cronicamente a este poluente, eles são capazes de sofrer uma resposta adaptativa, evitando os danos ao DNA.

Pavlica et al. (2001) realizaram o ensaio de cometa no molusco de água doce *Dreissena polymorpha*, exposto a concentrações crescentes de pentaclorofenol (PCP) em laboratório e também em exposição *in situ* em um rio que recebe efluentes urbanos e de indústrias químicas. Os autores observaram um aumento dose-dependente nos danos ao DNA detectados pelo ensaio do cometa, tanto para a exposição em laboratório quanto para a exposição *in situ*. Ao comparar os dados deste trabalho com outros que

utilizaram as mesmas concentrações deste composto, porém realizando o teste de micronúcleo, os autores indicaram que os dois testes apresentam sensibilidade similar. Além disso, os autores citam que o PCP pode atuar aumentando a taxa de consumo de oxigênio, devido a perda do controle respiratório da mitocôndria, fazendo com que aumente a produção de radicais livres de oxigênio que, por sua vez, danificam a molécula de DNA.

Os resultados encontrados por Siu et al. (2004) para o teste do cometa em *Perna viridis* exposto ao benzo(a)pireno indicaram que o aumento nos danos ao DNA ocorrem concomitantemente com o aumento das concentrações deste composto, porém foi encontrada uma diminuição destes danos nos animais expostos após o 12º dia em todas as concentrações testadas, o que pode demonstrar um limiar do sistema de reparo do DNA. Os autores compararam estes resultados com os obtidos com o teste do micronúcleo e concluíram que os dois testes podem ser utilizados como biomarcadores de exposição a compostos genotóxicos encontrados no ambiente marinho.

Ao comparar o ensaio do cometa em diferentes tecidos de *Curbicula fluminea*, um bivalve de água doce, Rigonato et al. (2005) notaram que, quando expostos ao agente alquilante metilmetanosulfonato, as células da hemolinfa fornecem melhores respostas do que as células da glândula digestiva e das brânquias, uma vez que são fáceis de serem manipuladas e possuem uma eficiente resposta a compostos danosos ao DNA. Rank e Jensen (2003) que realizaram teste semelhante com as células das brânquias e da hemolinfa de *Mytilus edulis* expostos também, a concentrações de metilmetanosulfonato, encontraram resultados semelhantes.

Rank et al. (2005) utilizaram o teste do cometa no mexilhão *Mytilus edulis* coletado em cinco pontos que recebem efluentes industriais e urbanos na costa da

Dinamarca. Em 1999, eles analisaram as brânquias e hemolinfa dos animais coletados e observaram que o nível de danos encontrados nas células das brânquias foi muito maior do que o das células da hemolinfa. Ao repetir o experimento em 2001, os autores utilizaram somente as brânquias para detectar danos ao DNA e puderam confirmar que os animais das regiões poluídas apresentaram níveis maiores de danos ao DNA, quando comparados com os animais coletados em áreas pouco impactadas. Os autores também afirmam que não foram observadas variações sazonais e que os resultados estavam correlacionados ao excesso de cromo, níquel e cádmio encontrado naquele ambiente.

Villela et al. (2006) submeteram o bivalve *Limnoperna fortunei* a diferentes concentrações de sulfato de cobre e pentaclorofenol, além de analisar animais expostos à radiação UV e à água contaminadas de um rio em Porto Alegre (RS, Brasil). Ao aplicarem o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa de forma combinada, os autores observaram correspondência das duas técnicas empregadas e concluíram que este mexilhão pode ser utilizado como indicador da presença de poluentes com atividade genotóxica em ambientes aquáticos.

4.6. Histopatologia

O impacto de poluentes em um organismo é percebido através de perturbações em diferentes níveis de complexidade funcional. Patologias celulares induzidas por doses subletais de substâncias tóxicas refletem perturbações de função e estrutura no nível molecular. Estas podem rapidamente se espalhar em uma rede complexa de associações secundárias e distúrbios de ordem maior, que podem se tornar progressivamente mais difíceis para a célula reverter ou modificar (MOORE, 1985).

A vantagem do uso da histopatologia como um biomarcador está em sua localização intermediária no que diz respeito ao nível de organização biológica (ADAMS et al., 1989 apud BERNET, 1999); alterações histológicas aparecem como uma resposta de meio termo a estressores subletais. A análise histológica proporciona um método rápido de detectar efeitos irritantes, especialmente aqueles considerados crônicos, em vários tecidos e órgãos (JOHNSON et al., 1993 apud BERNET, 1999).

Segundo Sunila (1987), as análises histopatológicas fornecem informação sobre a saúde geral dos animais e sobre modificações teciduais específicas para os diferentes contaminantes. O mesmo autor sugere que quando estudos histopatológicos são utilizados em programas de monitoramento, as alterações observadas devem ter um significado ecológico, devendo representar um efeito adverso no crescimento, reprodução ou na sobrevivência do indivíduo e da população.

A exposição de moluscos bivalves a substâncias químicas é capaz de induzir diversos tipos de lesão em uma variedade de órgãos (MARSHALL e TALBOT, 1979; MOORE, 1985; SUNILA, 1987, 1988a, 1988b; BALLAN-DUFRANÇAIS et al., 1990; GOLD-BOUCHOT et al., 1995; GREGORY et al., 1999; 2002; DIMITRIADIS e PAPADAKI, 2004).

A estrutura das brânquias dos moluscos bivalves é adequada para análises histopatológicas, já que é formada por um epitélio simples, composto de uma variedade de tipos celulares, onde facilmente se observa os efeitos de poluentes solúveis em água (SUNILA, 1988a).

Bernet et al. (1999), em estudo sobre peixes, afirmam que as brânquias e a pele são órgãos utilizados como marcadores primários para poluição aquática, pois

apresentam grande superfície que está em contato direto e permanente com substâncias irritantes em potencial.

Sunila (1987) apresentou um estudo histopatológico de moluscos da espécie *Mytilus edulis* provenientes de oito pontos ao longo do Golfo da Finlândia no Mar Báltico, sendo três destes pontos pouco poluídos e os outros cinco próximos à despejos de fábricas de aço e ferro. Neste estudo, diversos órgãos foram analisados, sendo as brânquias, as que tiveram grande prevalência de lesões. O autor ressaltou que apesar de os animais mais próximos às fábricas apresentarem maior quantidade de alterações patológicas, nenhuma das amostras coletadas representou aspectos saudáveis comparáveis a animais não expostos a estresse antropogênico.

Sunila (1988a) estudou as respostas histológicas de brânquias de *Mytilus edulis* expostos a uma variedade de substâncias como: sulfato de potássio, cloreto de cádmio, cloreto de cobre, nitrato de cobre, óxido de chumbo, cloreto de cobalto, cloreto de ferro, nitrato de prata, PCB e DDT. Neste trabalho, o autor apresentou as alterações frequentemente encontradas nas brânquias do grupo controle, além daquelas encontradas para cada tipo de composto estudado, propondo que algumas alterações podem ser exclusivas de certos compostos.

Gregory et al. (1999) ressaltaram a falta de estudos em bivalves no Hemisfério Sul e inicializaram uma série de estudos de histopatologia em um bivalve de ampla distribuição, o Mytilidae *Perna perna*. Neste estudo em especial, os autores analisaram, sob o Microscópio Eletrônico de Varredura, a superfície branquial de animais expostos ao mercúrio. Os autores não observaram alterações nos animais expostos até o oitavo dia, porém animais expostos por 16 até 24 dias apresentaram uma variedade de mudanças morfológicas como, aumento no diâmetro das microvilosidades, perda de

cílios da região abfrontal e aumento no número de cílios na superfície lateral. Os autores sugeriram o uso da espécie como indicador de toxicidade e o uso das brânquias em estudos de patologia.

Algumas alterações podem ser encontradas como resposta a outros fatores que não a exposição a poluentes. Em *Placopecten magellanicus* foi observado, sob o Microscópio Eletrônico de Varredura, um aumento na esfoliação de células epiteliais em jovens e adultos fora da época reprodutiva; concluiu-se que a esfoliação não pode ser relacionada apenas a aspectos reprodutivos, mas também a processos fisiológicos normais e renovação celular nos tecidos. Quando expostos a temperaturas mais elevadas foi observado aumento na esfoliação de células epiteliais (POTTER et al., 1997).

Também utilizando a exposição ao mercúrio, Bigas et al. (2001) analisaram o epitélio branquial de *Ostrea edulis*, sob o Microscópio Eletrônico de Transmissão, além de analisar a bioacumulação deste metal nas brânquias. Os autores observaram inúmeras alterações nas células ciliadas e de absorção a partir do 18º dia. Depois do 25º dia de exposição, diferentes estados de lise celular foram observados, sendo que este foi o momento em que se deu o pico máximo de acúmulo de mercúrio no tecido. Após estas observações, os autores concluíram que as células de absorção e as ciliadas são o alvo principal do mercúrio e de outros metais e que a hipertrofia das células mucosas ocorre como resposta a este poluente e pode contribuir com o processo de desintoxicação.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão também foi utilizada para estudos de histopatologia como o de Gregory et al. (2002), no qual os autores analisaram a resposta dos filamentos branquiais de *Perna perna* à exposição ao mercúrio e observaram uma série de alterações que foram recuperadas após o período em que os animais foram mantidos sem a presença do metal.

Um estudo utilizando a mesma técnica descrita acima foi realizado por Marshal e Talbot (1979), em exemplares de *Mytilus edulis* expostos ao cádmio e ao chumbo. Os autores não encontraram alterações morfológicas, mas conseguiram através da técnica de microanálise de raios-X, identificar depósitos dos dois elementos, que apareceram em locais distintos, sendo o chumbo acumulado extracelularmente como um depósito cristalino e o cádmio em vesículas no interior das células epiteliais da brânquia.

Bernet et al. (1999) em estudo de histopatologia em peixes, citam a presença de células mucosas nas brânquias e pele destes e citam estudos que comprovam que o muco produzido por elas, tem papel importante na resistência a doenças, contra organismos patogênicos e substâncias tóxicas, assim como uma variedade de outras funções.

O papel do muco também tem sido motivo de muita controvérsia entre os pesquisadores. Beninger et al. (1993) e Beninger e St-Jean (1997) concluíram que o muco tem um papel importante no transporte de partículas para ingestão, sendo que este muco teria características específicas para auxiliar na ingestão e ter papel na rejeição.

Para Jorgensen (1996), altas concentrações de partículas suspensas na água induzem a produção de muco. Partículas ligadas ao muco são transferidas até os palpos labiais, transformadas em pseudofezes e expelidas. Quando o muco é produzido, as chances de partículas serem capturadas, e então expelidas como pseudofezes, depende do tamanho, forma e outras características físicas da partícula, e não de sua qualidade, como por exemplo, seu valor alimentar.

Dufour e Beninger (2001) estudaram a distribuição das células mucosas em diversos bivalves e identificaram, através de testes histoquímicos, a característica deste muco produzido nas brânquias, discutindo o papel do muco e dos cílios abfrontais na

fisiologia dos animais. Ao analisar evolutivamente os dados encontrados nos diferentes grupos de bivalves utilizados no estudo, os autores chegaram a conclusão que a distribuição dos cílios abfrontais e das células mucosas podem refletir a pressão seletiva que age sobre as brânquias dos diferentes táxons analisados.

Tan e Lim (1984) relataram que a primeira resposta visível da exposição ao chumbo em *Perna viridis* é o aumento da produção de muco, que resulta em formação de espuma na água; sugeriram que o aumento na produção de muco em bivalves expostos a poluentes se dá devido ao aumento do número de células mucosas, chamadas pelos autores de glândulas de muco.

Sze e Lee (1995) detectaram aumento na produção de muco em bivalves expostos ao cobre e analisaram a concentração de cobre no muco secretado e nos tecidos de mexilhões expostos a este elemento. Os autores observaram que a concentração deste metal era até seis vezes mais alta no muco do que nos tecidos e afirmaram que esta é uma forma de manter o equilíbrio de metais no organismo, uma vez que o metal é secretado juntamente com o muco que é eliminado para o ambiente.

Kádár et al. (2001) ao analisar o bivalve de água doce *Anodonta cygnea* exposto a diferentes concentrações de alumínio, sugeriram que o muco tem papel na eliminação deste metal, uma vez que os autores identificaram elevadas concentrações do elemento nas pseudofezes de animais, durante e após os experimentos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

Indivíduos da espécie *Mytella falcata* (Figura 1) com aproximadamente 4,0 cm de comprimento foram coletados juntamente com a água dos respectivos pontos de coleta e levados até o laboratório, onde foram acomodados em aquários com 5 litros de água dos pontos de coleta com aeração constante; os animais foram mantidos nestas condições por no máximo uma semana antes de serem processados para as diferentes técnicas utilizadas. Este procedimento foi adotado a fim de minimizar os danos causados pelo estresse da coleta e do transporte dos animais. As coletas realizadas, o número de indivíduos coletas e as técnicas empregadas estão resumidos na Tabela 1.

5.2. Pontos de Coleta

Os animais foram coletados em três pontos diferentes do estuário de Santos: pontos A, B e C (Figura 2); estes pontos foram escolhidos devido à abundância de exemplares de *Mytella falcata* nos mesmos, além disso, estes pontos foram previamente estudados (CETESB, 2001), o que nos forneceu dados das características ambientais e dos poluentes neles presentes. Em dois dos pontos estudados (A e B), os bivalves coletados encontravam-se formando bancos no estuário, com os animais interconectados

pelo bisso e semi-enterrados no sedimento. Já no ponto C, os bivalves, apesar de estarem conectados pelo bisso, estavam presos a pilares de concreto, a aproximadamente 3 metros de distância do sedimento. Em todos os pontos de coleta, os bivalves se encontravam na região entremarés, sendo expostos ao ar nos períodos de maré baixa. Quando submersos (em maré alta), em todos os pontos de coleta, os bivalves ficavam, praticamente, à mesma distância da superfície da água (Figura 3).

O ponto A (23°55.052'S, 46°26.975'W) está localizado em uma região menos impactada por despejos industriais. O ponto B (23°54.659'S, 46°20.464'W) (Largo do Canéu) sofre influência do porto de Santos e, segundo Kummrow et al. (2006), o despejo de esgoto doméstico é a única fonte identificada de poluição. O ponto C (23°52.597'S, 46°22.583'W) localiza-se em frente a uma grande siderúrgica, é a área mais contaminada e recebe despejos da siderúrgica e de esgoto e, segundo Kummrow et al. (2006) as concentrações de HPA podem alcançar 347.55 µg/g de sedimento (peso seco). Na Tabela 2 estão resumidos os dados obtidos para os sedimentos da região em coletas de 1998 e 1999 realizadas pela CETESB retirados do relatório de 2001 sobre o sistema estuarino de Santos e São Vicente (CETESB, 2001); porém devemos ressaltar que estes dados podem não refletir as condições ambientais da época de realização deste trabalho.

5.3. Análise de micronúcleos

Para esta análise foram realizadas duas coletas (13/02/2006 e 27/08/2006) nas quais foram coletados 10 indivíduos totalizando 20 indivíduos por ponto amostral. Uma pequena abertura na concha dos bivalves foi feita a fim de retirar a hemolinfa dos exemplares. Em seguida, a hemolinfa foi colocada em tubos tipo ependorff contendo

fixador etanol: ácido acético (3:1) na proporção 1:1 de hemolinfa/fixador. A solução obtida foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o restante foi ressuspendido, gotejado sobre lâmina e deixado para secar em temperatura ambiente. Seguiu-se a reação de Feulgen para coloração do DNA. As lâminas foram analisadas sob o microscópio de luz com aumento de 1000x, sendo contadas 1000 células por indivíduo e considerados apenas os micronúcleos com diâmetro inferior a um terço do núcleo, de mesma coloração que o núcleo e claramente separados do mesmo. Os resultados foram expressos em número de células micronucleadas por mil células analisadas.

5.4. Teste de sensibilidade de tecidos para o ensaio do cometa

Foram preparadas soluções de metil metanosulfonato (MMS) com concentrações de 0,6; 1,2 e 2,4 x 10⁻⁴M. Cinco bivalves provenientes do ponto A (ponto menos impactado) foram colocados em cada concentração por 40 minutos; este tempo de exposição seguiu o experimento realizado por Rigonato et al. (2005). O grupo controle foi conduzido da mesma forma que os grupos expostos ao MMS, porém utilizando a água de manutenção dos indivíduos. A hemolinfa foi retirada, com auxílio de seringa, do músculo adutor posterior e alíquotas de 10 µL foram utilizadas para o ensaio do cometa. Pequenos fragmentos das brânquias foram retirados e gentilmente macerados em Tampão Fosfato Salino (PBS) para a obtenção de uma suspensão de células, da qual alíquotas de 10 µL foram submetidas ao ensaio do cometa como descrito no item 5.5.

5.5. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi aplicado no teste de sensibilidade de tecidos e nos animais residentes dos três pontos de coleta. Para a sensibilidade de tecidos foram

utilizados cinco indivíduos em cada concentração, sendo realizadas duas repetições do experimento, totalizando 10 indivíduos para cada grupo. Na análise dos animais residentes, foram realizadas duas coletas (13/02/2006 e 27/08/2006) nas quais 10 indivíduos foram coletados totalizando 20 indivíduos por ponto amostral.

O ensaio do cometa foi conduzido segundo Singh et al. (1988) com algumas modificações, descrito a seguir. Lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% foram cobertas com alíquotas de 10 μ L da suspensão celular misturada a 90 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%; as lâminas foram então cobertas com lamínula e colocadas no refrigerador para solidificação da agarose. Após a retirada da lamínula, as células foram submetidas à solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5) contendo 1% de Triton X-100 e 20% de DMSO por 1 hora a 4°C. Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e cobertas com tampão alcalino recém preparado (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH=12,1) por 20 minutos e posteriormente submetidas a eletroforese por 15 minutos a 21V e 270mA (0,8V.cm⁻¹). Todos estes passos foram conduzidos sob luz indireta. Depois disso, as lâminas foram neutralizadas em três banhos de 5 minutos de tampão pH 7,5, lavadas três vezes em água destilada e deixadas para secar “overnight” a temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 5%), lavadas três vezes em água destilada e secas por 2 horas a 37°C. As lâminas secas foram reidratadas por 5 minutos em água destilada e em seguida coradas (carbonato de sódio 5%, nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido silicotungstico 0,25%, formaldeído 0,15%, recém preparado e no escuro) sob constante agitação por 7 minutos a 37°C. Após

coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e submetidas à solução “stop” (ácido acético 1%), lavadas novamente e secas a temperatura ambiente.

Foram analisadas sob o microscópio de luz, com aumento de 1000x, 100 cometas por indivíduo. Os cometas foram classificados em categorias de migração, pelo grau de dano ao DNA, segundo Rigonato et al. (2005); foi calculado então o escore de dano como a soma do número de células em cada classe e o total de cada classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3); portanto, os escores podem variar de 0 (todas as células sem dano – 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo – 3x100). Recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram a análise visual dos cometas como um método de avaliação bem estabelecido que pode ser utilizado com alta confiabilidade (TICE et al., 2000).

5.6. Histopatologia

A análise de histopatologia foi realizada em 19 indivíduos do ponto A, 20 do ponto B e 13 do ponto C, a data de coleta dos diferentes indivíduos está resumida na Tabela 1. Os indivíduos coletados foram dissecados e as brânquias fixadas em solução de Paraformaldeído 4%. O material foi submetido a um banho em solução tampão fosfato por 24 horas e desidratado em sucessivos banhos de etanol em concentração crescente por 30 minutos cada. Em seguida, o material foi mantido em resina (Leica) para embebição na geladeira “overnight”. Posteriormente foi realizada a inclusão em resina com catalisador, os blocos foram levados para a estufa à 37° C para polimerização. Os blocos obtidos foram seccionados com 5 µm de espessura, em micrótomo com navalha de vidro, e colocados em lâminas para posterior coloração: as lâminas foram hidratadas em água destilada, coradas com Hematoxilina de Harris por

10 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos para reação; em seguida foram coradas com Eosina Aquosa por 5 minutos e lavadas em água. Após secagem, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá, observadas e fotografadas com filme TMAX asa 100, em fotomicroscópio ZEISS.

5.7. Método para detecção de proteínas totais – Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985)

O material foi fixado e processado conforme o item 5.6.; o número de indivíduos analisados foi o mesmo deste item. As lâminas foram hidratadas e coradas com solução de Azul de Bromofenol por 2 horas em temperatura ambiente; em seguida, foram lavadas em água, secas e montadas com Bálsamo do Canadá, para posterior observação e registro dos resultados em fotomicroscópio ZEISS.

5.8. Método para detecção de polissacarídeos – PAS (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983)

As brânquias de 19 indivíduos do ponto A, 20 do ponto B e 13 do ponto C (Tabela 1) foram fixadas em Bouin aquoso e lavadas por 5 vezes em tampão fosfato antes de seguir a mesma rotina descrita acima; os cortes obtidos foram submetidos à reação histoquímica para detecção de polissacarídeos, técnica de PAS. As lâminas foram colocadas em solução de ácido periódico 1% durante 30 minutos; em seguida, foram lavadas em água destilada, colocadas no reativo de Schiff por 1 hora, lavadas em água sulfurosa por 9 minutos e em água corrente por 30 minutos, secas e montadas com Bálsamo do Canadá. As lâminas foram observadas e fotografadas sob o fotomicroscópio ZEISS. Foi realizada também a contagem de células mucosas em 50

filamentos branquiais dos indivíduos analisados, estes dados foram expressos como número de células mucosas por 50 filamentos e submetidos à análise estatística.

5.9. Microscopia Eletrônica de Varredura

Fragmentos das brânquias de 10 indivíduos de cada ponto de coleta foram fixados em solução fixadora Karnovsky e desidratadas em séries crescentes de acetona. As amostras de brânquias foram levadas ao ponto crítico e coladas em suportes metálicos de forma a serem observados diferentes ângulos do material. O material foi então coberto com ouro, analisado e fotografado sob o Microscópio Eletrônico de Varredura Philips, operado a 12kV.

5.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Pequenos fragmentos das brânquias de 15 indivíduos de cada ponto amostrado foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M a 4°C, lavados em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material foi novamente lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas. Em seguida, foi desidratado em série crescente de acetona, submetido à solução resina:acetona (1:1) por 12 horas, embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado para estufa a 70°C por 24 horas para polimerização da resina. O material foi seccionado em ultramicrótomo e colocados sobre grades de cobre, que foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Phillips CM 100.

5.11. Análise estatística

No teste de sensibilidade de tecidos ao ensaio do cometa foi utilizado o teste estatístico de Kruskal Wallis associado ao teste de Dunn. Já para o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em animais residentes foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) juntamente com o teste de Dunnett.

Na contagem de células mucosas foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com o teste de Dunnett, para comparação entre os pontos de coleta.

6. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Número de indivíduos utilizados em cada técnica nas diferentes coletas realizadas.

Data	Ponto de coleta	Micronúcleo	Cometa	Histopatologia			
				MEV	Histologia	Histoquímica	MET
20/06/03	seleção dos pontos	*	*	-	-	-	-
10/10/03	seleção dos pontos	*	*	-	*	-	-
07/05/04	A			5	4	4	
	B	*	*	5	5	5	-
	C			5	3	3	
07/10/04	A			5	5	5	
	B	*	*	5	5	5	-
	C			5	-	-	
3/10/05	A				5	5	5
	B	*	*	-	5	5	5
	C				5	5	5
13/02/06	A	10	10		5	5	5
	B	10	10	-	5	5	5
	C	10	10		5	5	5
27/08/06	A	10	10				5
	B	10	10	-	-	-	5
	C	10	10				5

MEV = microscopia eletrônica de varredura; MET = microscopia eletrônica de

transmissão; *adequação da técnica; - análise não realizada

Tabela 2. Concentração de alguns poluentes encontrados nos sedimentos dos três pontos estudados no estuário de Santos (CETESB, 2001).

Substâncias analisadas	A	B	C	
As	0,65	4,50	3,83	
Cd	0,98	<0,05	1,38	
Pb	26,33	15,00	219,66	
Cu	20,33	12,00	39,33	
Metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Cr	34,33	36,33	56,00
	Mn	232,66	208,66	967,66
	Hg	0,40	0,70	0,66
	Ni	19,66	12,33	25,00
	Zn	60,00	55,66	698,33
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	37,46	620,73	320553,3	
Solventes aromáticos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	11,41	<1,00	39,39	
Bifenilas policloradas (PCB) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	4,43	1,08	30,24	
Pesticidas organoclorados ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	9,00	<1,00	<1,00	
Compostos fenólicos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	62,86	121,26	1952,32	



Figura 1. Conchas de exemplares de *Mytella falcata*.

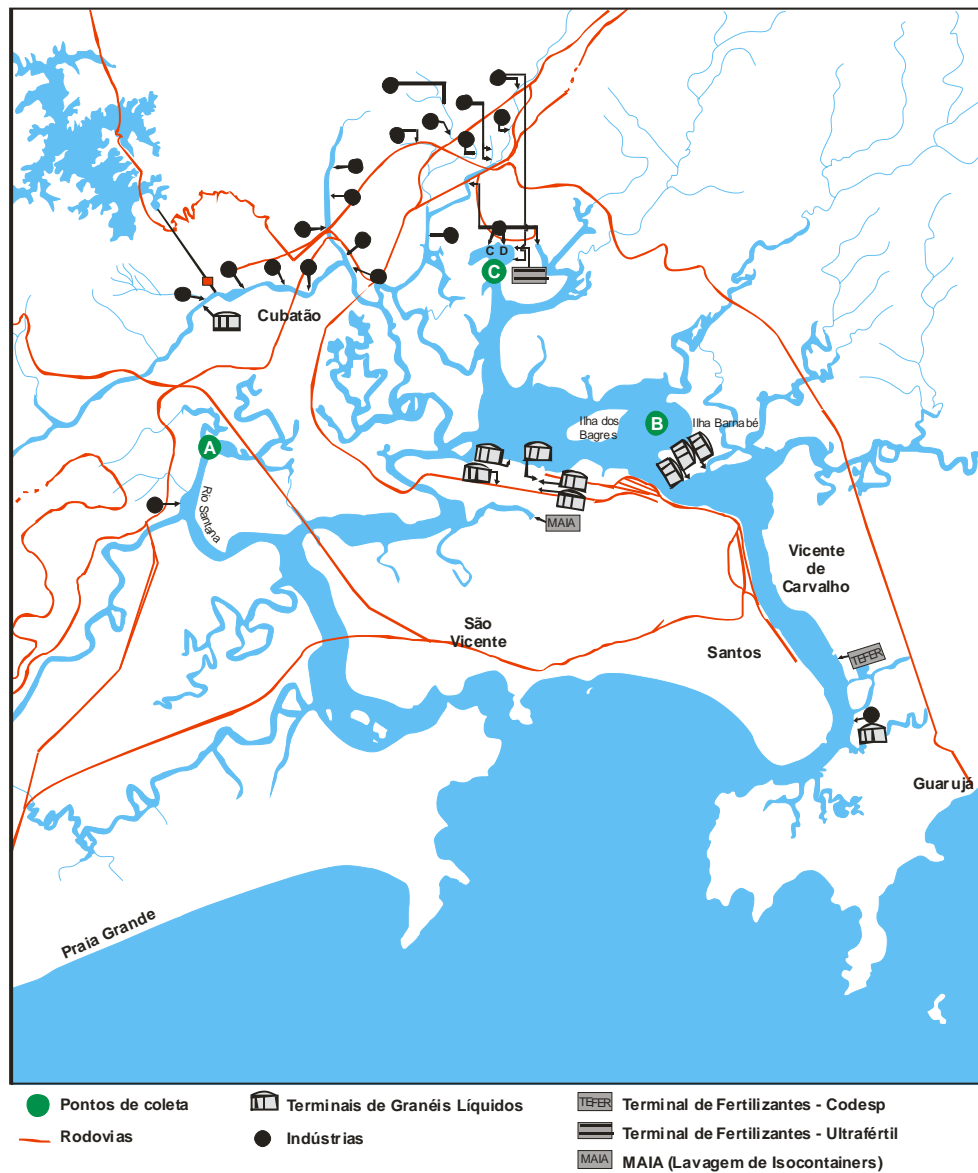


Figura 2. Mapa do estuário de Santos com os pontos de coleta e algumas das principais fontes poluidoras.

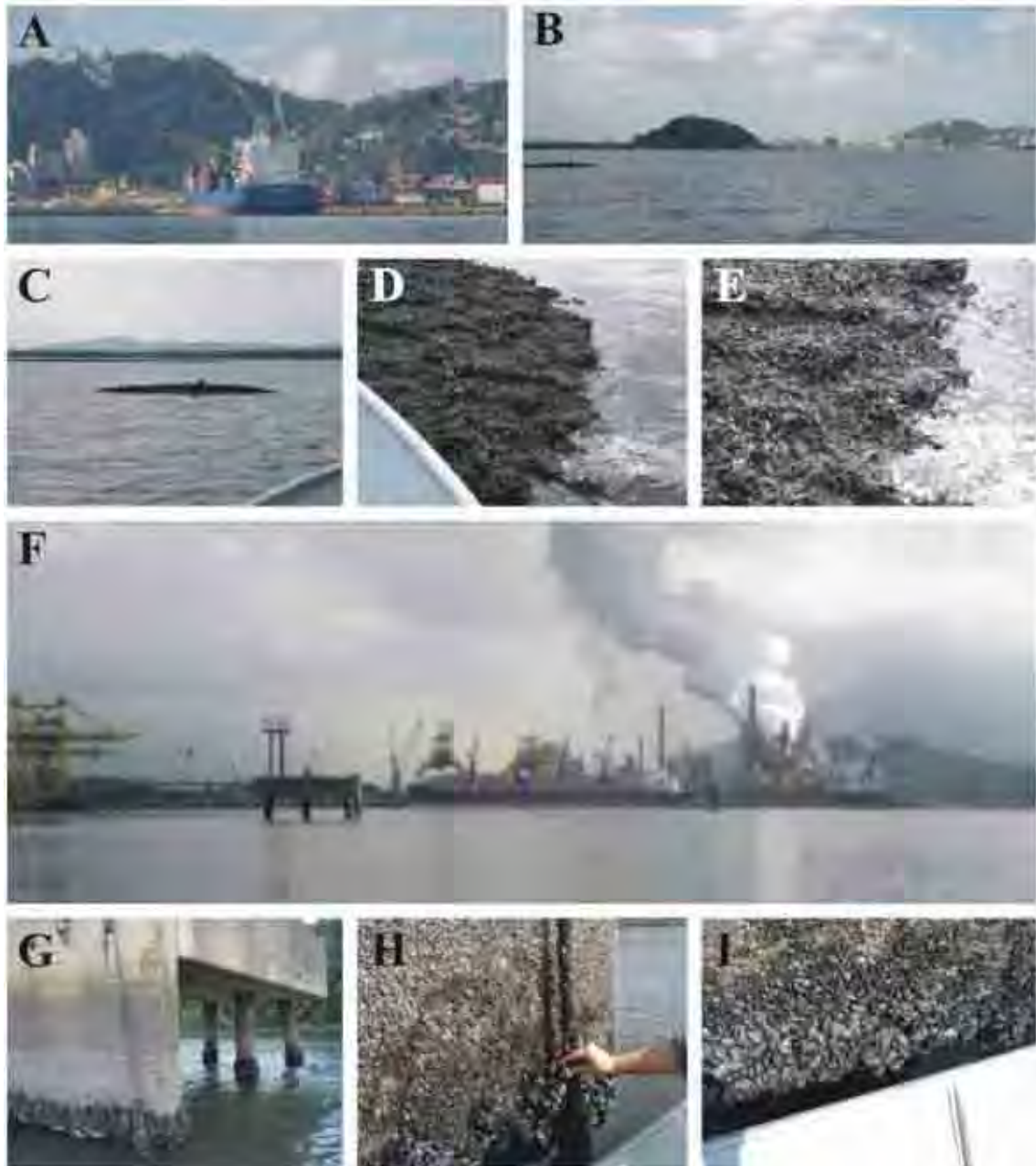


Figura 3. Posição dos animais em relação ao substrato nos pontos B (A-E) e C (F-I).

7. RESULTADOS

Os resultados obtidos foram separados e discutidos na forma de sete artigos e seguem a formatação estipulada pelas revistas a que serão submetidos, com a finalidade de facilitar a compreensão dos diferentes aspectos abordados neste estudo.

7.1. Comparação do ensaio do cometa em diferentes tecidos de *Mytella falcata*.

Este artigo será enviado para o periódico “Cell Biology and Toxicology” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo.

Comparação do ensaio do cometa em diferentes tecidos de *Mytella falcata*.

José Augusto de Oliveira David*, Márcia M. Hoshina, Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor para correspondências: Tel.: +55 19 35264135; fax: +55 19 35264136.

E-mail: zedavid@bol.com.br

1. Resumo

Bivalves filtradores são animais sésseis frequentemente utilizados como sentinelas em ambientes aquáticos; por esta razão, é importante a identificação de espécies nativas-chaves em ambientes tropicais. Este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar se a espécie *Mytella falcata*, um bivalve estuarino de regiões tropicais, poderia ser utilizada na detecção de danos genotóxicos por meio do ensaio do cometa. Estudos com *M. falcata* são de grande interesse, uma vez que esta vive semi-enterrada no sedimento e pode fornecer dados sobre as condições do mesmo. Indivíduos desta espécie foram expostos *in vivo* a três concentrações de metil metanosulfonato (MMS) (0,6; 1,2 e $2,4 \times 10^{-4}$ M) por 40 minutos. As células da hemolinfa e das brânquias foram submetidas ao ensaio do cometa, a fim de avaliar a resposta dos dois tecidos; um grupo controle, não exposto ao agente mutagênico, foi conduzido da mesma forma. Foi detectado aumento nos danos ao DNA de acordo com o aumento das concentrações de MMS nos dois tecidos analisados. Foi concluído que as células da hemolinfa de *M. falcata* são um melhor material para estudos de genotoxicidade, já que são facilmente obtidas e apresentam menores níveis basais quando comparadas com as células das brânquias.

Palavras-chave: Bivalvia, brânquias, ensaio do cometa, genotoxicidade, hemolinfa, metil metanosulfonato.

2. Introdução

A poluição influencia diretamente a vida aquática. Mudanças no genoma da célula, causadas por agentes genotóxicos, podem levar a mutações e possivelmente à formação de tumores. Desta forma, agentes que danificam o DNA devem ser detectados

e continuamente monitorados (Villela et al 2006). Por esta razão, análises capazes de medir o efeito de substâncias poluidoras devem ser desenvolvidas e aplicadas em uma grande variedade de organismos.

Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de microeletroforese para detectar danos ao DNA em células individualizadas. Singh et al (1988) aperfeiçoaram esta técnica utilizando condições alcalinas; estas adaptações são utilizadas até hoje, sendo o método denominado ensaio do cometa.

Comparado a outros ensaios de genotoxicidade, as vantagens do ensaio do cometa incluem: sua sensibilidade para a detecção de baixos níveis de danos ao DNA; necessidade de um pequeno número de células por amostra; baixo custo; facilidade de aplicação; habilidade de conduzir estudos utilizando quantidades relativamente pequenas da substância testada e o tempo relativamente curto para completar o experimento (Tice et al, 2000).

Segundo Dixon e Wilson (2000), a molécula de DNA nos invertebrados marinhos expressa os danos induzidos por substâncias químicas de forma muito similar ao registrado para os organismos superiores, validando a importância e a aplicabilidade dos testes genotoxicológicos nestes grupos animais. Porém, a maioria dos estudos utilizando mexilhões como biomonitoros marinhos tem sido conduzida em regiões temperadas utilizando espécies do gênero *Mytilus* (Nicholson e Lam, 2005). Estas espécies, não são encontradas com frequência em regiões tropicais onde, assim como em outras áreas, estratégias para monitoramento de poluição são necessárias (Tavares et al, 1988).

A espécie *Mytella falcata* é um bivalve encontrado no litoral Atlântico, desde a Venezuela até a Argentina e também na costa do Pacífico e Ilhas Galápagos (Narchi e

Galvão-Bueno, 1983). Considerado de grande importância alimentar, é amplamente consumido em várias regiões do nordeste brasileiro, muitas vezes sendo a única fonte de proteína de alguns povoados mais pobres (Boffi, 1979). A espécie é de grande interesse em estudos de biomonitoramento, pois é encontrado semi-enterrado em regiões estuarinas, fornecendo dados sobre as condições do sedimento (Narchi e Galvão-Bueno, 1983).

A espécie *Mytella falcata* apresenta grande distribuição no estuário de Santos, onde é consumida por grande parte da população; esta região é altamente impactada com substâncias lançadas no meio pelo maior porto da América Latina (Porto de Santos) e pelo pólo petroquímico de Cubatão que abriga cerca de 1110 indústrias. Desta forma, este trabalho foi realizado com o intuito de adaptar o ensaio do cometa para as células de *Mytella falcata* e analisar se o ensaio do cometa pode ser utilizado nesta espécie como indicador de danos ao DNA, a fim de utilizar esta espécie no biomonitoramento constante do estuário de Santos e outros estuários onde a espécie ocorre. Durante o experimento foi comparada a sensibilidade de dois tecidos (hemolinfa e brânquias), expostos *in vivo*, ao agente genotóxico metil metanosulfonato.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Animais da espécie *Mytella falcata* foram coletados em fevereiro de 2006 (n=5) e agosto de 2006 (n=5) em um braço de mar, próximo ao Rio Queiroz no estuário de Santos (Brasil) (23°55.052'S, 46°26.975'W); esta área é pouco impactada e não sofre influência direta de indústrias. Os animais coletados foram levados para o laboratório, onde foram mantidos em aquários de 5L com água do ponto de coleta por 5 dias. A

água dos aquários foi mantida sobre constante aeração e 1L de água foi trocado diariamente.

3.2. Teste de sensibilidade de tecidos

A água obtida no ponto de coleta foi utilizada para a preparação das soluções de metil metanosulfonato (MMS) com concentrações de 0,6; 1,2; e $2,4 \times 10^{-4}$ M, sendo que cinco bivalves foram colocados em cada solução por 40 minutos, este tempo de exposição foi utilizado seguindo a metodologia dos experimentos de Rigonato et al (2005). O grupo controle foi conduzido da mesma forma que os grupos expostos ao MMS, porém utilizando a água de manutenção coletada em campo. A hemolinfa foi retirada, com auxílio de seringa, do músculo adutor posterior e alíquotas de 10 μ L foram utilizadas para o ensaio do cometa. Pequenos fragmentos das brânquias foram retirados e gentilmente macerados em PBS (tampão fosfato salino) para a obtenção de uma suspensão de células, da qual alíquotas de 10 μ L foram submetidas ao ensaio do cometa. Dois testes independentes foram conduzidos a fim de confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

3.3. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi conduzido segundo Singh et al (1988), com algumas modificações descritas a seguir. Lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% foram cobertas com alíquotas de 10 μ L das diferentes suspensões celulares misturadas a 90 μ L agarose de baixo ponto de fusão 0,5%; as lâminas foram então cobertas com lamínula e colocadas no refrigerador para solidificação da agarose. Após a retirada da lamínula, as células foram submetidas à solução de lise (2,5M NaCl,

100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5) contendo 1% de Triton X-100 e 20% de DMSO por 1 hora a 4°C. Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e cobertas com tampão alcalino recém preparado (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH=12,1) por 20 minutos e posteriormente submetidas a eletroforese por 15 minutos a 21V e 270mA (0,8V.cm⁻¹). Todos estes passos foram conduzidos sob luz indireta. Depois disso, as lâminas foram neutralizadas em três banhos de 5 minutos de tampão pH 7,5, lavadas três vezes em água destilada e deixadas para secar “overnight” a temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 5%), lavadas três vezes em água destilada e secas por 2 horas a 37°C. As lâminas secas foram reidratadas por 5 minutos em água destilada e em seguida coradas (carbonato de sódio 5%, nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido silicotungstico 0,25%, formaldeído 0,15%, recém preparado e no escuro) sob constante agitação por 7 minutos a 37°C. Após coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e submetidas à solução “stop” (ácido acético 1%), lavadas novamente e secas a temperatura ambiente.

Foram analisadas sob o microscópio de luz, com aumento de 1000x, 100 cometas por indivíduo. Os cometas foram classificados em categorias de migração, pelo grau de dano ao DNA, segundo Rigonato et al. (2005); foi calculado então o escore de dano como a soma do número de células em cada classe e o total de cada classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3); portanto, os escores podem variar de 0 (todas as células sem dano – 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo – 3x100). Recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram a análise visual dos cometas como um método de avaliação bem estabelecido e que pode ser utilizado com alta confiabilidade (Tice et al, 2000).

3.4. Análise estatística

O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar os controles com as células expostas *in vivo* às diferentes concentrações de MMS. O teste de Dunn foi utilizado para detectar entre quais grupos houve diferença.

4. Resultados

A voltagem e o tempo de corrida utilizados neste estudo foram determinados experimentalmente; porém, os resultados de todos os testes não serão apresentados, uma vez que este não é o objetivo deste trabalho e fazem parte das alterações necessárias para a execução do ensaio do cometa.

A quantidade de DMSO utilizada (20%) foi aumentada para diminuir a quantidade de danos detectados. O pH>13 resultou na detecção de muitos danos no DNA dificultando a análise dos resultados, já que requeria ajustes muito grandes em voltagem e tempo de corrida. Por outro lado, o pH 12,1 minimizou os danos ao DNA e permitiu que o ensaio fosse conduzido com maior precisão.

As duas repetições apresentaram dados muito similares e, por isso, foram analisados conjuntamente. Os resultados aqui obtidos mostraram aumento nos escores, de acordo com o aumento nas concentrações de MMS, tanto para as células de hemolinfa como para a suspensão de células branquiais. Foi observada uma tendência à estabilização dos danos nas concentrações mais altas (Figura 1).

Quando comparamos a média dos escores obtidos para o grupo controle da hemolinfa ($57,5 \pm 28,9$) e para o grupo controle das células branquiais ($106,1 \pm 32,9$),

observamos que as células da hemolinfa apresentaram menores níveis de dano, enquanto as células das brânquias apresentaram elevados níveis basais de dano.

Foi observada diferença significativa entre as células da hemolinfa do grupo controle ($57,5 \pm 28,9$) e as concentrações $1,2 \times 10^{-4}$ M ($125,2 \pm 24,2$) e $2,4 \times 10^{-4}$ M ($127,5 \pm 30,6$). Apesar da concentração $0,6 \times 10^{-4}$ M ter apresentado aumento nos escores ($101,7 \pm 24,2$) em relação ao controle, não houve diferença significativa entre o grupo controle e a mesma.

Os resultados encontrados para as células branquiais expostas a $0,6 \times 10^{-4}$ M ($110,8 \pm 38,8$), $1,2 \times 10^{-4}$ M ($111,2 \pm 37,7$) e $2,4 \times 10^{-4}$ M ($124,6 \pm 44,27$) não apresentaram diferença significativa em relação aos dados encontrados para o grupo controle ($106,1 \pm 32,9$).

5. Discussão

Desde a publicação da técnica do ensaio de cometa, inúmeros trabalhos já aplicaram tal técnica em uma grande gama de organismos e tecidos, sendo necessárias uma série de pequenas alterações para a execução da mesma. Sendo assim, algumas alterações na técnica foram feitas neste estudo com base em outros estudos como o de Villela et al (2006) e em experiências anteriores realizadas em nosso laboratório. As principais alterações realizadas neste estudo foram o aumento na concentração de DMSO (dimetilsulfoxido) e a utilização do pH 12,1.

A concentração de DMSO (20%) foi aumentada na solução de lise uma vez que experimentos anteriores mostraram que o uso da concentração recomendada (10%) resultou em altos níveis de dano no DNA de *M. falcata*. O DMSO é um solvente amplamente utilizado e também conhecido por sua alta afinidade por radicais hidroxila

(Repine et al, 1981); sendo assim, uma vez que a ruptura dos compartimentos celulares é necessária para a realização do ensaio do cometa, e este processo pode extravasar substâncias prejudiciais ao DNA, o aumento na concentração de DMSO previne a indução de danos ao DNA durante o processamento do material.

A variação de pH durante os processos de lise e eletroforese está relacionada ao tipo de quebras do DNA que são expressas. Quando as células são lisadas e submetidas à eletroforese sob pH neutro, somente as quebras na fita dupla de DNA são detectadas. Sob pH 12,3 quebras na fita dupla e na fita simples são detectadas, enquanto sob pH>13 são detectados, além das quebras em fita dupla e simples, os sítios álcali-lábeis (Lee e Steinert, 2003). Devido ao fato de detectar maior variedade de danos ao DNA, o pH>13 é amplamente utilizado e o mais recomendado, principalmente para células de vertebrados (Tice et al, 2000).

Por outro lado, os danos ao DNA, em particular as quebras na fita simples, não possuem um efeito tão drástico, uma vez que são rapidamente reparadas. Já as quebras na fita dupla são lesões muito mais severas em efeito, além de terem via de reparo mais complexa. As lesões na fita dupla podem, desta forma, ser consideradas como de maior importância e podem ser visualizadas sob pH neutro. No caso dos bivalves marinhos e dos poliquetas, que apresentam alta incidência natural de sítios álcali-lábeis, o pH neutro pode ser considerado como mais informativo do que o amplamente utilizado, pH>13 (Dixon et al, 2002).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório com o ensaio do cometa em células de bivalves utilizando o pH>13 mostraram altos níveis de dano. Desta forma, levando em consideração outros trabalhos que se mostraram eficientes na detecção de danos genotóxicos em bivalves (Villela et al, 2006), o fato dos danos genotóxicos mais

significativos serem detectados com pH neutro e as características do DNA dos bivalves marinhos (Dixon et al, 2002), este estudo utilizou o pH 12,1 (levemente alcalino) na realização do ensaio do cometa.

Experimentos com substâncias genotóxicas, que apresentam efeitos conhecidos sobre a molécula do DNA, são realizados a fim de validar o ensaio do cometa em organismos ainda não utilizados como bioindicadores (Rank e Jensen, 2003; Rigonato et al, 2005; Villela et al, 2006).

Rank e Jensen (2003) aplicaram o ensaio do cometa em células da hemolinfa e das branquias de *Mytilus edulis* expostos ao MMS, a peróxido de hidrogênio e a radiação UV e concluíram que os dois tecidos são igualmente sensíveis a estes agentes, porém devido a facilidade de obtenção das células da hemolinfa, este tipo celular seria mais indicado em estudos de genotoxicidade.

Siu et al (2004) afirmaram que a utilização de células da hemolinfa para ensaios de genotoxicidade é mais interessante devido, entre outros fatores, ao seu importante papel na defesa imune, na fagocitose e no transporte, excreção e detoxificação de xenobióticos. Além disso, foi sugerido que seu papel multifuncional lhes confere maior sensibilidade perante fatores externos como xenobióticos genotóxicos.

Os resultados obtidos aqui para os diferentes tecidos de *Mytella falcata*, foram muito similares aos encontrados por Rigonato et al (2005) em *Corbicula fluminea*, um bivalve de água doce. Ao aplicar o ensaio do cometa nas células da hemolinfa, da glândula digestiva e das brânquias deste bivalve exposto ao MMS, os autores concluíram que esta espécie é boa bioindicadora de agentes genotóxicos. Porém, ressaltaram que as células branquiais parecem ser menos apropriadas por apresentarem altos níveis basais de danos ao DNA, o que pode mascarar os resultados.

Mitchelmore et al (1998) sugeriram que os valores relativamente altos dos controles não são resultados de quebras no DNA causados por agentes endógenos ou artificiais, mas são características gerais de invertebrados, que estão relacionadas com a forma de empacotamento do DNA destes animais. Outro fator que deve ser considerado é que ao realizar o ensaio do cometa em diferentes tecidos, o dano normal ao DNA pode ser altamente variável; isto porque certos tipos celulares, apresentam níveis basais diferentes de quebras simples de DNA, devido a variações na atividade de reparo por excisão, atividade metabólica, concentração de antioxidantes ou outros fatores (Lee e Steinert, 2003).

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre o controle e os grupos expostos de células branquiais, isto pode ter ocorrido devido aos altos níveis basais do grupo controle, ocasionados, provavelmente, pela variedade de tipos celulares encontrados nas brânquias, que podem responder diferentemente ao mutágeno a que foram submetidas; ou como resultado da manipulação do tecido para obtenção da suspensão celular.

Um fato que deve ser levado em conta é que a hemolinfa também apresenta dois tipos celulares, porém, ao analisar os dados obtidos percebemos que a variação de danos neste tecido é menor do que aquele detectado nas células branquiais. Isto pode ser explicado pelo fato das brânquias apresentarem muitos tipos celulares, com funções muito específica, enquanto na hemolinfa temos apenas dois tipos celulares com funções muito similares.

6. Conclusões

A utilização do pH 12,1, o aumento na quantidade de DMSO (20%) e as condições de corrida permitiram uma melhor visualização das quebras no DNA, minimizando os danos no grupo controle e facilitando a análise dos resultados. Estes resultados mostraram uma clara relação entre os danos e as concentrações do agente genotóxico utilizado, principalmente em relação às células da hemolinfa. As células branquiais apresentaram altos níveis basais que podem mascarar os verdadeiros efeitos dos agentes genotóxicos. Os dados aqui apresentados mostraram que o ensaio do cometa pode ser aplicado com maior precisão nas células da hemolinfa de *Mytella falcata*, para detecção de danos genotóxicos. Desta forma, esta espécie pode ser utilizada para avaliar efeitos genotóxicos em regiões estuarinas e tropicais como o estuário de Santos.

7. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, CNPq e FUNDUNESP pelo suporte financeiro, à “Náutica da Ilha” pela ajuda nas coletas e a Gislaïne Fontanetti Bortolotti pelo auxílio nas análises estatísticas.

8. Referências bibliográficas

Boffi AV. Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico. São Paulo: HUCITEC; 1979.

Dixon DR, Wilson JT. Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia*. 2000; 420: 29-43.

Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ, Jha NA. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological. *Mutagenesis*. 2002; 17: 495-507.

Lee RF, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res*. 2003; 544: 43-64.

Mitchelmore CL, Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res*. 1998; 399: 135-147.

Narchi W, Galvão-Bueno MS. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *Bolm. Zool. Univ. S. Paulo*. 1983; 6: 113-145.

Nicholson S, Lam PKS. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ. Int*. 2005; 31: 121-132.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1984; 123: 291-298.

Rank J, Jensen K. Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 2003; 54: 323-329.

Repine JE, Pfenninger OW, Talmage DW, Berger EM, Pettijohn DE. Dimethylsulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron/hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78:1001-1003.

Rigonato J, Mantovani MS, Jordão BQ. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.* 2005; 28: 464-468.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175: 184-191.

Siu WHL, Caob J, Jack RW, Wu RSS, Richardson BJ, Xud L, Lama PKS. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna perna*). *Aquat. Toxicol.* 2004; 66: 381-392.

Tavares TM, Rocha VC, Porte C, Barcelo D, Albaiges J. Application of the mussel watch concept in studies of hydrocarbons, PCBs and DDT in the brazilian bay of Todos os Santos (Bahia). *Mar. Pollut. Bull.* 1988; 19: 575-578.

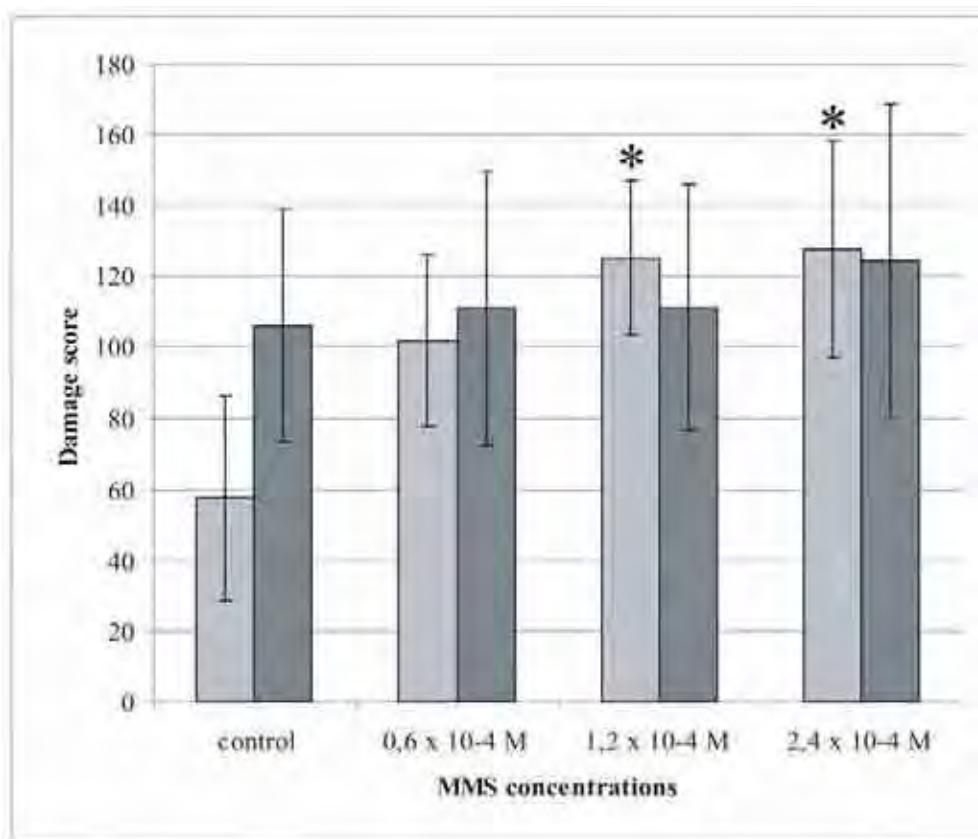
Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35: 206-221.

Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JAP. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.* 2006; 605: 78-86.

LEGENDAS

Figura 1. Média e desvio padrão dos escores de dano encontrados para as células da hemolinfa (cinza claro) e das brânquias (cinza escuro) do grupo controle e após a exposição a três concentrações de metil metanosulfonato (MMS). (*diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$)

Figura 1



7.2. Brânquias do sururu *Mytella falcata* como indicadoras de genotoxicidade no estuário de Santos.

Este artigo será enviado para o periódico “Genetics and Molecular Biology” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo.

Brânquias do sururu *Mytella falcata* como indicadoras de genotoxicidade no estuário de Santos.

running title: Danos genotóxicos em Santos

José A. O. David*, Márcia M. Hoshina, Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor para correspondência: Tel.: +55 19 35264135; fax: +55 19 35264136

E-mail: zedavid@bol.com.br

Resumo

O ensaio do cometa vem sendo amplamente utilizado em análises ambientais; é um teste rápido e eficiente na detecção de danos ao DNA. No estuário de Santos (SP), é lançada diariamente, uma série de compostos resultantes de processos industriais e do trânsito de navios do porto; muitos destes são altamente danosos para o material genético e formam um grande depósito nos sedimentos da região. O sururu *Mytella falcata*, um bivalve sésil e filtrador, é encontrado por todo estuário de Santos, formando grandes bancos de animais semi-enterrados no sedimento; por apresentar estas características, podem ser considerados bons bioindicadores. Neste estudo, foram analisados os danos genotóxicos nas brânquias de sururus coletados em três pontos (A, B e C) do estuário de Santos que apresentam diferentes níveis de contaminação dos sedimentos. Não foi detectada diferença significativa na quantidade de danos ao DNA nos pontos analisados sendo a média de escore encontrado no ponto A igual a 89,33, no ponto B igual a 93,5 e no ponto C igual a 100,8. Concluiu-se que isto pode ter ocorrido devido a formação de danos originados durante a obtenção da suspensão de células branquiais, ou pelo fato de animais cronicamente expostos a poluentes, apresentarem sistema de reparo mais eficiente, evitando a formação de danos. Sendo assim, este estudo recomenda uma melhor adequação da técnica antes da utilização das brânquias em estudos de genotoxicidade em amostras ambientais.

Palavras-chave: ensaio do cometa, exposição crônica, moluscos, poluição, sedimento.

1. Introdução

O grande desenvolvimento industrial ocorrido no século XX, trouxe inúmeros benefícios para o ser humano, mas, ao mesmo tempo, levou as condições ambientais à um colapso. A maioria dos processos industriais resulta na formação de resíduos que, direta ou indiretamente, alcançam os recursos hídricos, prejudicando sua qualidade tanto para a manutenção da biodiversidade quanto para o ser humano.

Na Baixada Santista, várias substâncias tóxicas são lançadas no sistema estuarino, tais como: metais, compostos orgânicos, hidrocarbonetos de petróleo e outros que por sua complexidade requerem estudos científicos mais detalhados da região (Braga et al., 2000).

Desde 1984 várias iniciativas foram tomadas para o controle das principais fontes de poluição na região, tendo sido observada uma sensível melhora da qualidade dos despejos e conseqüentemente, da qualidade das águas (CETESB, 2001). Porém, os sedimentos da região ainda estão contaminados, refletindo mais de 50 anos de poluição; essa matriz pode ser importante fonte de poluição das águas e da biota, mesmo após a eliminação das fontes primárias de contaminação (Umbuzeiro et al., 2004).

Dos organismos utilizados como bioindicadores, os bivalves têm se destacado nas últimas décadas; muitos deles apresentam hábito sésil e filtrador, característica importante em estudos de bioacumulação de poluentes orgânicos e de metais (Rittschof e McClellan-Green, 2005). Entre eles está a espécie *Mytella falcata*, que possui ampla distribuição na América Latina e é de grande interesse em estudos de biomonitoramento, pois é encontrado semi-enterrado em regiões estuarinas, fornecendo dados sobre as condições do sedimento (Narchi e Galvão-Bueno, 1983).

O ensaio do cometa é um teste amplamente utilizado em estudos de genotoxicidade; nele, núcleos celulares isolados são submetidos à uma solução alcalina para relaxamento do DNA e passam por uma eletroforese, na qual os fragmentos de DNA migram assumindo o aspecto de um cometa, sendo que o tamanho da cauda do cometa reflete a extensão do dano ao DNA.

Com a finalidade de analisar a resposta de indivíduos da espécie *Mytella falcata* à exposição crônica a que estão submetidos no estuário de Santos, este trabalho utilizou o ensaio do cometa nas células branquiais de animais coletados em três pontos do estuário com diferentes graus de degradação ambiental.

2. Material e métodos

2.1. Material

Indivíduos de *Mytella falcata* foram coletados em janeiro de 2006. Os animais foram coletados em três pontos diferentes do estuário de Santos com diferentes graus de ação antrópica, denominados pontos A, B e C (Figura 1).

Após a coleta, 10 indivíduos de cada ponto, com aproximadamente 4,0 cm de comprimento, foram levados para o laboratório e mantidos em aquários com água proveniente dos pontos de coleta por 24 horas, para depois serem submetidos ao ensaio do cometa. Este procedimento foi adotado a fim de evitar a influência do stress da coleta e do transporte dos animais.

2.2. Pontos de coleta

Os pontos aqui analisados foram escolhidos devido a abundância de exemplares de *Mytella falcata* e por terem sido previamente estudados (CETESB, 2001), o que nos

forneceu dados ambientais e dos poluentes neles presentes. Os três pontos são canais estuarinos que sofrem a influência das marés e possuem águas salobras.

O ponto A (23°55.052'S, 46°26.975'W) é um local pouco impactado quando comparado aos outros pontos; mostra baixas concentrações de poluentes no sedimento, exceto para os pesticidas organoclorados.

O ponto B (23°54.659'S, 46°20.464W) (Largo do Canéu) sofre influência do porto de Santos e apresenta sedimento com altas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e mercúrio.

O ponto C (23°52.597'S, 46°22.583'W) sofre influência direta de uma grande siderúrgica e apresenta os sedimentos mais contaminados, com altas concentrações de HPA, além de solventes aromáticos e metais como chumbo e zinco.

A análise da água nessas regiões não demonstrou concentrações de poluentes superiores às estabelecidas pela legislação pertinente. Estes dados de contaminação ambiental na região foram obtidos a partir do relatório 2001 da CETESB (CETESB, 2001).

2.3. Ensaio do cometa

Pequenos fragmentos das brânquias foram retirados dos 10 indivíduos analisados de cada ponto de coleta e gentilmente macerados em PBS (tampão fosfato salino) para a obtenção de uma suspensão de células, a qual foi utilizada para a realização do ensaio do cometa.

O ensaio foi conduzido segundo Singh et al. (1988) com algumas modificações, descrito a seguir. Lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% foram cobertas com alíquotas de 10 µL da suspensão celular misturada a 90 µL de

agarose de baixo ponto de fusão 0,5%; as lâminas foram então cobertas com lamínula e colocadas no refrigerador para solidificação da agarose. Após a retirada da lamínula, as células foram submetidas à solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5) contendo 1% de Triton X-100 e 20% de DMSO por 1 hora a 4°C. Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e cobertas com tampão alcalino recém preparado (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH=12,1) por 20 minutos e posteriormente submetidas a eletroforese por 15 minutos a 21V e 270mA ($0,8V.cm^{-1}$). Todos estes passos foram conduzidos sob luz indireta. Depois disso, as lâminas foram neutralizadas em três banhos de 5 minutos de tampão pH 7,5, lavadas três vezes em água destilada e deixadas para secar “overnight” a temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 5%), lavadas três vezes em água destilada e secas por 2 horas a 37°C. As lâminas secas foram reidratadas por 5 minutos em água destilada e em seguida coradas (carbonato de sódio 5%, nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido silicotungstíco 0,25%, formaldeído 0,15%, recém preparado e no escuro) sob constante agitação por 7 minutos a 37°C. Após coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e submetidas à solução “stop” (ácido acético 1%), lavadas novamente e secas a temperatura ambiente.

As lâminas obtidas foram analisadas sob o microscópio de luz, com aumento de 1000x e 100 cometas foram analisados por indivíduo. Os cometas foram classificados em categorias de migração, pelo grau de dano ao DNA, segundo Rigonato et al. (2005); foi calculado então o escore de dano como a soma do número de células em cada classe e o total de cada classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3); portanto, os escores podem variar de 0 (todas as células sem dano – 0×100) a 300 (todas as células com dano

máximo – 3x100). Recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram a análise visual dos cometas como um método de avaliação bem estabelecido que pode ser utilizado com alta confiabilidade (Tice et al., 2000).

2.4. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) com o teste de Dunnett, para comparação entre os pontos de coleta.

3. Resultados

A média dos escores obtidos para os diferentes pontos de coleta teve um pequeno aumento de acordo com o grau de contaminação ambiental encontrado em cada ponto; porém, ao realizar a análise estatística, não foi detectada diferença significativa entre estes pontos. Os bivalves residentes no ponto A apresentaram os menores níveis de dano ($89,33 \pm 9,29$), seguido dos animais do ponto B ($93,5 \pm 21,88$) e finalmente os do ponto C ($100,8 \pm 31,44$), sendo este último, o ponto com maiores níveis de contaminação do sedimento (Figura 2).

4. Discussão

Os resultados aqui encontrados concordam com estudos previamente realizados na região estuarina de Santos (Kummrow et al., 2006; Umbuzeiro et al., 2006), nos quais o ponto C, próximo a uma siderúrgica, apresenta os maiores níveis de poluentes e os maiores índices de mutagenicidade e genotoxicidade.

Estes dados concordam com estudos como o de Rank et al. (2005). Os autores utilizaram o teste do cometa no mexilhão *Mytilus edulis* coletado em pontos que

recebem efluentes industriais e urbanos na costa da Dinamarca. Em 1999, eles analisaram as brânquias e hemolinfa dos animais coletados e observaram que o nível de danos encontrados nas células das brânquias foi maior do que o das células da hemolinfa. Ao repetir o experimento em 2001, os autores utilizaram somente as brânquias para detectar danos ao DNA e puderam confirmar que os animais das regiões poluídas apresentaram níveis maiores de danos ao DNA, quando comparados com os animais coletados em áreas pouco impactadas.

Por outro lado, não houve diferença significativa entre os pontos amostrados neste estudo; isto pode ter ocorrido pelo fato de todos os pontos apresentarem substâncias tóxicas capazes de causar lesão no DNA; ou ainda, ao fato de animais cronicamente expostos a poluentes apresentarem mecanismos mais eficientes para lidar com poluentes ambientais e evitarem a formação de danos ao DNA. Outro fato que pode ter influenciado nos resultados é a formação de danos durante a obtenção da suspensão celular.

Quando um órgão alvo é analisado, diferentes tipos celulares são lisados na mesma preparação. Estes tipos celulares podem apresentar especificidade para o ataque de determinados agentes mutagênicos, o que pode resultar em uma distribuição heterogênea e uma superestimação da variabilidade dos resultados após os tratamentos (Gontijo e Tice, 2003). Uma forma de evitar tais problemas seria diferenciar os tipos celulares lisados na realização do teste, porém, o tecido branquial apresenta inúmeros tipos celulares, cada um com uma função específica e um grau de condensação de DNA diferente, sendo muito difícil a individualização de cada tipo celular após a realização do ensaio do cometa.

Estudos realizados com diferentes tecidos de bivalves mostraram que tanto células da hemolinfa, como as da glândula digestiva ou das brânquias fornecem resultados adequados para o ensaio do cometa. A diferença entre os tecidos seria, principalmente, a forma como estes devem ser manipulados até ser obtida uma suspensão de células antes da realização do teste (Rank e Jensen, 2003, Rigonato et al., 2005, David et al., artigo 1).

As células branquiais formam um epitélio com fortes ligações entre as células e, para a obtenção de uma suspensão capaz de ser submetida ao ensaio do cometa, devem ser dissociadas mecanicamente, o que pode originar quebras indesejadas na molécula de DNA.

Large et al. (2002) aplicaram o ensaio do cometa em *Mytilus edulis* coletados em um local com altas concentrações de HPA e os comparou com animais de um ponto de referência; os autores observaram que não havia diferenças entre os resultados das duas áreas. Realizaram também um ensaio em laboratório, fornecendo alimento contaminado para os animais; observaram um aumento de quebras na fita de DNA nos primeiros dias do teste, mas no 14º dia de exposição à alimentação contaminada, foi observado um grande declínio nos danos, indicando que quando estes moluscos são expostos cronicamente a este poluente, eles são capazes de sofrer uma resposta adaptativa evitando os danos ao DNA.

5. Conclusão

Os resultados aqui obtidos mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os pontos estudados, sendo encontrado um pequeno aumento nos escores de acordo com o nível de contaminação encontrado nos mesmos. Isto pode ser

devido aos danos gerados durante o manuseio das células branquiais que podem ter mascarado os resultados, ou pelo fato dos animais dos pontos poluídos responderem de forma diferente, devido a adaptações geradas pela exposição crônica a que estão submetidos. Sendo assim, este estudo recomenda uma melhor adequação da técnica antes da utilização das brânquias em estudos de genotoxicidade em amostras ambientais.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, ao CNPq e à FUNDUNESP pelo suporte financeiro, à “Náutica da Ilha” em Cubatão pela ajuda nas coletas, à Cristiane M. Mileo, pelas ilustrações e à Rogilene Aparecida Prado pela ajuda na execução das técnicas.

7. Referências bibliográficas

Braga ES, Bonetti CVDH, Burone L e Bonetti-Filho J (2000) Eutrophication and bacterial pollution cause by industrial and domestic waste at the Baixada Santista estuarine system – Brasil. Mar Pollut Bull 40:165-175.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) (2001) Relatório: Sistema estuarino de Santos e São Vicente. São Paulo, SP: CETESB.

David JA, Hoshina MM e Fontanetti CS (Artigo 1) Comparação do ensaio do cometa em diferentes tecidos de *Mytella falcata*.

Gontijo AMMC and Tice R (2003) Teste do cometa para detecção de dano ao DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF and Marques EK (eds) Mutagênese ambiental. 1^a edição. Ed. Ulbra, Canoas, pp. 247-279.

Kummrow F, Rech CM, Coimbra CA e Umbuzeiro GA (2006) Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutat Res* 609:60-67.

Large AT, Shaw JP, Peters LD, McIntosh AD, Webster L, Mally A e Chipman JK (2002) Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 54: 493-497.

Narchi W e Galvão-Bueno MS (1983) Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *Bolm. Zool. Univ. S. Paulo* 6:113-145.

Rank J e Jensen K (2003) Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:323-329.

Rank J, Jensen K e Jespersen PH (2005) Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat Res* 585: 33-42.

Rigonato J, Mantovani MS e Jordão BQ (2005) Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genet Mol Biol* 28:464-468.

Rittschof D e McClellan-Green P (2005) Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar Pollut Bull* 50:369-373.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR e Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC e Sasaki YF (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.

Umbuzeiro GA, Kummrow F, Deborah AR e Tominaga MY (2006) Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. *Environ Int* 32:359-364.

Umbuzeiro GA, Roubicek DA, Stoppe NC, Rodrigues PF, Rech CM, Coimbra CA e Sato MIZ (2004) Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeogúimicos. *O mundo da saúde* 28:436-443.

LEGENDAS

Figura 1. Mapa da região de estudo com os pontos amostrais.

Figura 2. Média e desvio padrão dos escores de dano ao DNA dos indivíduos de *Mytella falcata* submetidos ao ensaio do cometa.

Figura 1

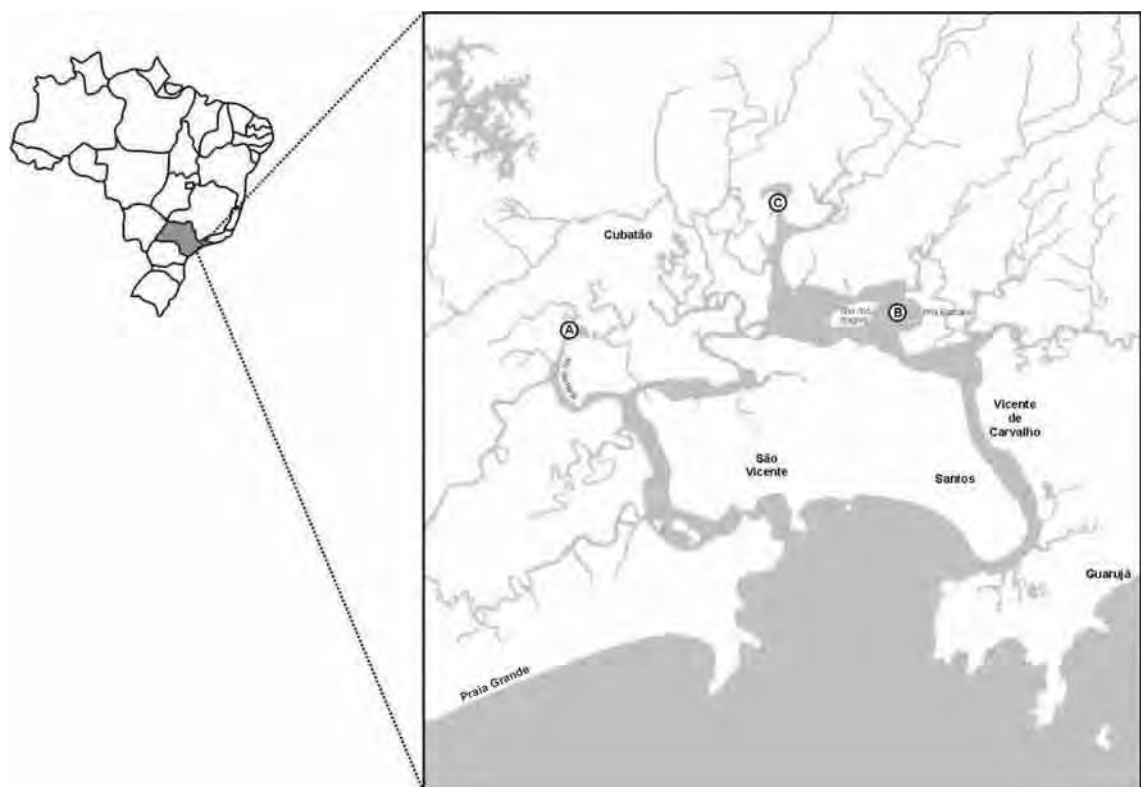
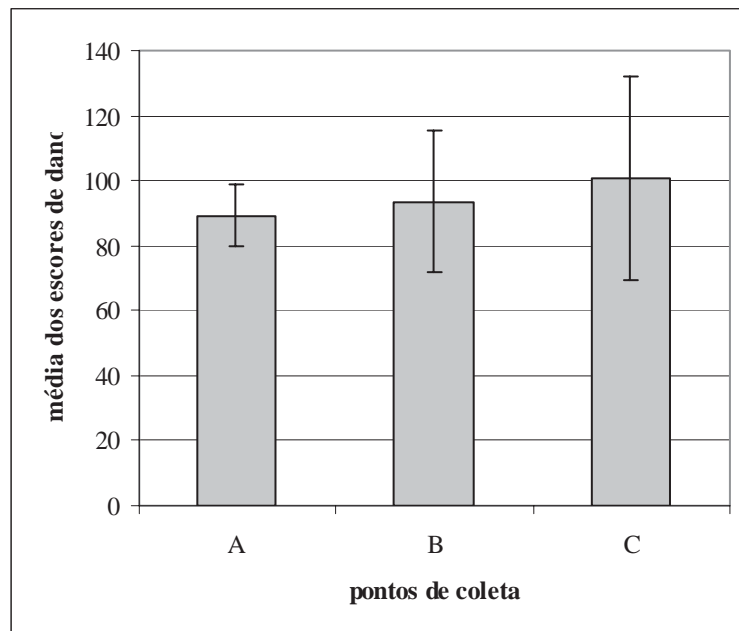


Figura 2



7.3. Danos ao DNA em células da hemolinfa de *Mytella falcata* (Bivalvia) provenientes do estuário de Santos (Brasil)

Este artigo será enviado para o periódico “Environment International” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo.

Danos ao DNA em células da hemolinfa de *Mytella falcata* (Bivalvia) provenientes do estuário de Santos (Brasil).

José Augusto de Oliveira David,*Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor para correspondências: Tel.: 55 19 35264135; fax: 55 19 35264136.

E-mail: joseaugustodavid@gmail.com

Indivíduos de *Mytella falcata* foram coletados em janeiro de 2006 (verão) e agosto de 2006 (inverno), a fim de detectar possíveis variações sazonais. Os animais foram coletados em três pontos diferentes do estuário de Santos com diferentes graus de ação antrópica: pontos A, B e C (Figura 1). Após a coleta, 10 indivíduos de cada ponto, com aproximadamente 4,0 cm de comprimento, foram levados para o laboratório e mantidos em aquários com água proveniente dos pontos de coleta por 24 horas, para depois serem submetidos ao ensaio do cometa e ao teste de micronúcleo. Este procedimento foi adotado a fim de evitar a influência do estresse da coleta e do transporte dos animais.

2.2. Pontos de coleta

Os pontos de coleta aqui analisados foram escolhidos devido a abundância de exemplares de *Mytella falcata* nos mesmos; além disso, estes pontos foram previamente estudados (CETESB, 2001), o que nos forneceu dados das características ambientais e dos poluentes neles presentes. Os três pontos são canais estuarinos que sofrem a influência das marés e possuem águas salobras. Em dois dos pontos estudados (A e B), os bivalves coletados encontravam-se formando bancos no estuário, com os animais interconectados pelo bisso e semi-enterrados no sedimento. Já no ponto C, os bivalves, apesar de estarem conectados pelo bisso, estavam presos a pilares de concreto, a aproximadamente 3 metros de distância do sedimento. Em todos os pontos de coleta, os bivalves se encontravam na região entremarés, sendo expostos ao ar nos períodos de maré baixa. Quando submersos (em maré alta), em todos os pontos de coleta, os bivalves ficavam, praticamente, à mesma distância da superfície da água

O ponto A (23°55.052'S, 46°26.975'W) está localizado em uma região menos impactada por despejos industriais. O ponto B (23°54.659'S, 46°20.464'W) (Largo do Canéu) sofre influência do porto de Santos e, segundo Kummrow et al. (2006), o despejo de esgoto doméstico é a única fonte identificada de poluição. O ponto C (23°52.597'S, 46°22.583'W) localiza-se em frente a uma grande siderúrgica, é a área mais contaminada e recebe despejos da siderúrgica e de esgoto e, segundo Kummrow et al. (2006) as concentrações de HPA podem alcançar 347.55 µg/g de sedimento (peso seco). Na Tabela 1 estão resumidos os dados obtidos para os sedimentos da região em coletas de 1998 e 1999 realizadas pela CETESB retirados do relatório de 2001 sobre o sistema estuarino de Santos e São Vicente (CETESB, 2001). A análise da água nessas regiões não demonstrou concentrações de poluentes superiores à estabelecidas pela legislação pertinente (CETESB, 2001).

2.3. Análise de micronúcleos

Uma pequena abertura na concha dos bivalves foi feita a fim de retirar a hemolinfa de cada um dos 10 indivíduos obtidos em cada coleta por ponto amostral. Em seguida, a hemolinfa foi colocada em tubos tipo ependorff contendo fixador etanol: ácido acético (3:1) na proporção 1:1 de hemolinfafixador. A solução obtida foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o restante foi ressuspensionado, gotejado sobre lâmina e deixado para secar em temperatura ambiente. Seguiu-se a reação de Feulgen para coloração do DNA. As lâminas foram analisadas sob o microscópio de luz com aumento de 1000x, sendo contadas 1000 células por indivíduo e considerados apenas os micronúcleos com diâmetro inferior a um terço do núcleo, de mesma

7. Referências bibliográficas

Burgeot, T.; Woll, S.; Galgani, F. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French Coasts. Mar. Pollut. Bull. 32: 39-46; 1996.

Carvalho Pinto-Silva, C.R.; Ferreira, J.F.; Costa, R.H.R.; Belli Filho, P.; Creppy, E.E.; Matias, W.G. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. Toxicol. 41: 93-97; 2003.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). Relatório: Sistema estuarino de Santos e São Vicente. São Paulo, SP: CETESB; 2001.

Chen, G.; White, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. Mutat. Res. 567:151-225; 2004.

David, J.A.O.; Fontanetti, C.S. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos Estuary. Braz. J. Morphol. Sci. 22:203-210; 2005.

Depledge, M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. Mutat. Res. 399:109-122; 1998.

Dixon, D.R.; Wilson, J.T. Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* 420:29-43; 2000.

Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutat. Res.* 586: 47-57; 2005.

Klobucar, G.I.V.; Pavlica, M.; Erben, R.; Papes, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.* 64:15-23; 2003.

Kummrow, F.; Rech, C.M.; Coimbra, C.A.; Umbuzeiro, G.A. Blue rayon-anchored technique *Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutat. Res.* 609:60-67; 2006.

Mersch, J.; Beauvais, M.; Nagel, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.* 371:47-55; 1996.

Mersch, J.; Beauvais, M.N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutat. Res.* 393:141-149; 1997.

Mozeto, A.A.; Zagatto, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti, E., eds. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa; 2006.

Narchi, W.; Galvão-Bueno, M.S. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (DOrbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). Bolm. Zool. Univ. S. Paulo 6:113-145; 1983.

Pampanin, D.M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G., Nasci, C. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). Environ. Pollut. 136: 103-107; 2005.

Rigonato, J.; Mantovani, M.S.; Jordão, B.Q Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. Genet. Mol. Biol. 28:464-468; 2005.

Silva, M.; Umbuzeiro, G.A.; Pfenning, L.H.; Canhos, V.P.; Esposito, E. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. Soil Sediment Contam. 12:345-356; 2003.

Singh, N.P.; Mccoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175:184-191; 1988.

Siu, W.H.L.; Caob, J.; Jack, R.W.; Wu, R.S.S.; Richardson, B.J.; Xud, L.; Lama, P.K.S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna perna*). *Aquat. Toxicol.* 66:381-392; 2004.

Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. Single Cell GelComet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206-221; 2000.

Umbuzeiro, G.A.; Kummrow, F.; Deborah, A.R.; Tominaga, M.Y. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. *Environ. Int.* 32:359-364; 2006.

Umbuzeiro, G.A.; Roubicek, D.A.; Stoppe, N.C.; Rodrigues, P.F.; Rech, C.M.; Coimbrão, C.A.; Sato, M.I.Z. Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeogúimicos. *O mundo da saúde* 28:436-443; 2004.

Villela, I.V.; Oliveira, I.M.; Silva, J.; Henriques, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.* 605: 78-86; 2006.

Villela, V.I., Oliveira, I.M., Silveira, J.C., Dias, J.F., Henriques, J.A.P., Silva, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. Mutat. Res. 628: 76-86; 2007.

Tabela 1. Concentração de alguns poluentes encontrados nos sedimentos dos três pontos estudados no estuário de Santos (CETESB, 2001).

Substâncias analisadas	A	B	C	
As	0,65	4,50	3,83	
Cd	0,98	<0,05	1,38	
Pb	26,33	15,00	219,66	
Cu	20,33	12,00	39,33	
Metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Cr	34,33	36,33	56,00
	Mn	232,66	208,66	967,66
	Hg	0,40	0,70	0,66
	Ni	19,66	12,33	25,00
	Zn	60,00	55,66	698,33
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	37,46	620,73	320553,3	
Solventes aromáticos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	11,41	<1,00	39,39	
Bifenilas policloradas (PCB) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	4,43	1,08	30,24	
Pesticidas organoclorados ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	9,00	<1,00	<1,00	
Compostos fenólicos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	62,86	121,26	1952,32	

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de micronúcleos encontrados em 1000 células dos indivíduos de *Mytella falcata*.

	Ponto A	Ponto B	Ponto C
Janeiro de 2006 (verão)	8,14 ±3,48	10,28 ±5,21	9,28 ±5,34
Agosto de 2006 (inverno)	7,25 ±3,19	11,00 ±2,70	9,20 ±2,49

Tabela 3. Média e desvio padrão dos escores de dano ao DNA dos indivíduos de *Mytella falcata* submetidos ao ensaio do cometa.

	Ponto A	Ponto B	Ponto C
Janeiro de 2006 (verão)	57,55 \pm 8,91	108,62 \pm 3,55*	94,00 \pm 7,51*
Agosto de 2006 (inverno)	62,88 \pm 7,67	92,11 \pm 3,28*	95,44 \pm 1,40*

*P < 0,05; **P < 0,01 (teste em relação ao ponto A)

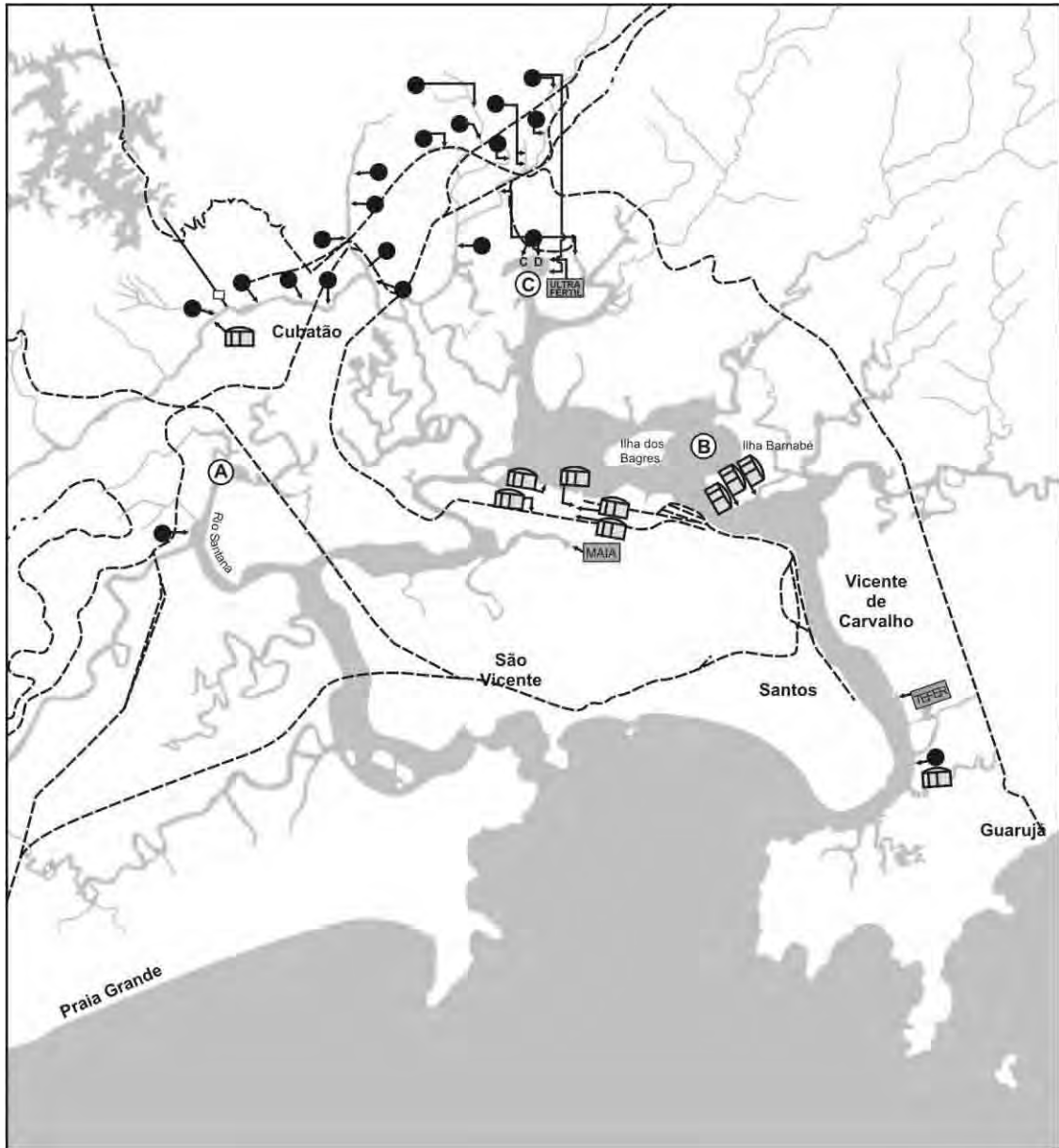
Tabela 4. Resumo de dados encontrados por outros autores, nos grupos controle ou pontos de referência, na análise de células da hemolinfa com micronúcleos em outras espécies de bivalves.

referência	espécie	micronúcleos (‰)
Burgeot et al. 1996	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	4,2
Mersch e Beauvais 1997	<i>Dreissena polymorpha</i>	2
Carvalho Pinto-Silva et al 2003	<i>Perna perna</i>	5,0
Klobucar et al 2003	<i>Dreissena polymorpha</i>	0,5
Siu et al 2004	<i>Perna viridis</i>	0,5
Jha et al 2005	<i>Mytilus edulis</i>	2 a 5
Pampanin et al 2005	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1
Villela et al 2006	<i>Limnoperna fortunei</i>	4,1
Villela et al 2007	<i>Limnoperna fortunei</i>	4,9

LEGENDAS

Figura 1. Mapa da região de estudo com os pontos amostrais e fontes poluidoras. ○ = pontos de coleta; ● = indústrias; --- = rodovias; ☐ = terminais de granéis líquidos; ☐^{MAIA} = terminais de fertilizantes e lavagem de isocontainers.

Figura 1



7.4. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of Santos estuary.

Este artigo foi publicado no periódico “Brazilian Journal of Morphological Sciences” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo.

DAVID, J.A.O., FONTANETTI, C.S. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos Estuary. **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 22, p. 203-210, 2005.

Title: “Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of Santos estuary.”

José Augusto de Oliveira David and Carmem S. Fontanetti

Department of Biology, Institute of Biosciences, Paulista State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

Running title: “*Mytella falcata* gill filaments.”

Correspondence to: José Augusto de Oliveira David

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, nº1515, CP199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

Tel: (55) (19) 3526-4139/3526-4135, Fax: (55) (19)3526-4136. E-mail: zedavid@bol.com.br

José Augusto de Oliveira David and Carmem S. Fontanetti

“Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of Santos estuary.”

Braz. J. Morphol. Sci.

Bivalves have been extensively used to monitor aquatic habitats because their sedentary filter feeding habit results in the accumulation of elements from the environment. The genus *Mytella* is of special interest because its habit of burrowing in sediments can provide information about the substrate conditions in estuaries. Gill filaments have a large surface that is in constant contact with the water and therefore are used to monitor aquatic environments. In this study, we used scanning electron microscopy (SEM) to investigate the morphology of *Mytella falcata* gill filaments and to compare the gill structure in specimens from three sites (A, B and C) of the Santos estuary in southeastern Brazil. Site A presents low levels of pollutants, whereas sites C and B were directly affected by industrial discharges and harbor pollutants. The gill filaments of *M. falcata* have three types of cilia, namely, lateral cilia, eu-latero-frontal cirri and frontal cilia. Structures joining the inner and outer lamellae were found on the abfrontal surface, in addition to the presence of composite and simple cilia. A comparison of the filaments of bivalves from the three sites revealed no morphological alterations, but there was an accumulation of mucus on the frontal surface of the gill filaments of specimens collected at site B. This mucus may function as a protective barrier against pollutants. Bivalves from site C showed no such alteration, even though this site had the highest levels of pollutants. This lack of alterations may reflect the fact that these specimens were collected from concrete pillars where there would be less contact with

pollutants. Our findings may reflect a long-term adaptation of these mollusks to chronic exposure to pollutants.

Keywords: Bivalvia, gill filaments, Mytilidae, pollution, SEM

INTRODUCTION

Mangroves are peculiar ecosystems, mainly because of the presence of seawater and fresh water and their frequent tidal inundation. The high pH and abundance of sulfites in mangrove sediments creates an environment with a high reducing capacity that results in a greater precipitation of metals. In addition, wave action tends to move water and sediment towards the estuary, thereby preventing the escape of sediments and nutrients from the ecosystem [16] and increasing the local concentration of metals.

Bivalve mollusks are sedentary, filter-feeding invertebrates that have been widely used to monitor aquatic habitats [6]. Their use to study the impact of pollutants is of such importance that some countries have adopted an International Mussel Watch program to monitor pollutants using mussels. Most of the studies using this concept have been done in the northern hemisphere, mainly in Europe and the United States. However, recently, some studies have been initiated in the southern hemisphere using *Perna perna*, a common bivalve with a widespread distribution [11]. In Southeast Asia, *Perna viridis*, another mussel typical of that region, has been used [19]. Mussels have also served to monitor the concentration of pollutants in seawater in Brazil [26,27].

The bivalve genus *Mytella* contains a variety of species that live buried in the sediment and can form large colonies interconnected with other specimens by their byssus. In some cases, these mollusks anchor themselves to rocks or the roots of estuarine plants or even concrete pillars. *Mytella* species are of great interest for biomonitoring aquatic environments because they can provide information about the conditions of the estuarine sediments in which they burrow [18]. *Mytella falcata* is distributed along the Atlantic coast of South America, from Venezuela to Argentina,

and also along the Pacific coast and around the Galapagos Islands [18]. Considered as an important food source, this species is widely consumed in northeastern Brazil, where it is frequently the only source of protein in some regions [4].

Several techniques have been used to evaluate the levels of pollutants in mytilid mussels, including the morphological analysis of gill filaments [1,8,10,11,24,25]. Such analyses are particularly useful since the gill epithelium is in constant contact with the water and its pollutants. In this study, we used scanning electron microscopy (SEM) to describe the morphology of the gill filaments of *M. falcata* in specimens collected from three localities of the Santos estuary in southeastern Brazil. These sites varied in their degree of disturbance and pollution by human activity.

MATERIAL AND METHODS

The specimens of *M. falcata* were collected at three sites in the Santos estuary, on the coast of São Paulo state, in southeastern Brazil. The three sites (site A - 23°55.052'S, 46°26.975'W, site B - 23°54.659'S, 46°20.464'W and site C - 23°52.597'S, 46°22.583'W) (Fig. 1) corresponded to sites 12, 6 and 5, respectively, in the CETESB (Environmental Sanitation Technology Company) report on this area [5].

The concentrations of some pollutants found in the sediment of this ecosystem are shown in Table 1. The highlighted values are above the levels considered as "Probable Effect Level" (PEL) by Environment Canada [5]. Site C had large amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) followed by site B. High quantities of organochlorine pesticides were present at site A, but the other parameters indicated that this site was less affected than sites B and C.

Two collections were made at each site, with five bivalves being collected in each case, i.e. 10 bivalves per site. At sites A and B, the bivalves were found buried in the sediment and connected by their byssus, while at site C they were found anchored to concrete pillars, at some distance above the sediment surface.

All of the specimens were transported to the laboratory where they were washed and their shells were opened by sectioning the posterior adductor muscle. Undamaged areas of the gill were excised, fixed in Karnovsky fixative [15] and dehydrated in an acetone series. The gill samples were subsequently critical point dried and glued at stubs at different angles to allow comprehensive analysis of the gill filament using a Philips scanning electron microscope operated at 12 kV.

RESULTS

Mytella falcata gill filaments consisted of two ctenidia, each formed by two V-shaped demibranchs. Each demibranch had inner and outer lamellae connected by projections on their abfrontal surface (arrow in Fig. 2A). All of the filaments have the same homorhabdic shape. When compared with the frontal surface (Fig. 3C), the abfrontal surface had a larger interfilamentar space (Fig. 2A,B) and had scattered composite (arrowhead in Fig. 2B) and simple (arrow in Fig. 2B) cilia.

The lateral surface (Fig. 3A,B) showed no ciliation, but ciliary disks were observed at regular intervals (Figs. 2B and 3A). These ciliary disks were located at the top of small elevations of the lateral epithelium and were responsible for connecting the filaments. Drops of mucus were seen on the abfrontal and lateral surfaces (Fig. 3B). All

the particles captured are conducted to a marginal groove (Fig. 3D) in the ventral region of the gill filament and then directed to the oral region.

The frontal surface of the filament was totally covered by cilia classified as frontal cilia, eu-latero-frontal cirri and lateral cilia. The first of these formed a single row and were partially concealed by eu-laterofrontal cirri (Fig. 3C). The eu-laterofrontal cirri were longer than the frontal cilia, ramified at their tip and arranged in two rows immediately below the frontal cilia (Fig. 4A,C). This arrangement of the eu-laterofrontal cirri formed a fine mesh for particle retention. The lateral cilia were numerous and were inserted in the filament below the eu-laterofrontal cirri (Fig. 3A).

There were no morphological differences among bivalves from the three sites. The ciliation showed the same distribution and the ciliary disks had the same appearance. The only difference was that at site B there was an increase in the number of mucus drops that accumulated in the frontal region of the filament (Fig. 4A,B); this phenomenon was not seen in specimens from site C (Fig. 4C).

DISCUSSION

The position and distribution of the cilia seen here in the frontal region of *M. falcata* gill filaments were the same as reported in other Mytilidae species such as *Perna perna* [9] and *Mytilus edulis* [20,22]. The ramifications of the eu-latero-frontal cirri are apparently important for particle retention by filter feeding bivalves, as discussed elsewhere [17,20]. The lateral cilia are the only cilia responsible for pumping water into the bivalve shell. However, based on a study of the role of abfrontal cilia in *M. edulis* and other eulamelibranchs, Jones *et al.* [14] concluded that the abfrontal cilia

have an important role in pumping water towards the exhalant siphon immediately after passing through the interfilamentar space.

The abfrontal ciliation of *M. falcata* was scattered and very similar to that described for the abfrontal surface of ordinary filaments in the posterior region of *Modiolus modiolus* gills by Dufour and Beninger [7]. According to these authors, this ciliation is not involved in water pumping. Silvester [23] stated that efficient pumping of water occurs when the cilia occur in high densities, such as in the band of lateral cilia on the gill filaments of *M. edulis*. Dufour and Beninger [7] stated that the abfrontal surface is a vestigial mucociliary epithelium and that the different distributions of cilia and mucocytes seen on the abfrontal surfaces of bivalve gills result from selective forces that vary in nature and degree. Our findings demonstrate a distribution of cilia similar to other Mytilidae [7] and indicate that this arrangement is characteristic of this type of gill.

The role of mucus in food transportation has been extensively studied. Beninger and St-Jean [2] and Beninger *et al.* [3] concluded that mucus has an important role in selecting particles that will be ingested and those that will be rejected. Studies with fish exposed to metals have reported an increase in the production of the mucus that covers the body and gills [12,13,28]. This increased mucus production may serve as a protective barrier to pollutants, as a binding site to capture heavy metals before they can damage the tissue, or as a means of expelling pollutants absorbed by secretory and other cells.

The CETESB (Environmental Sanitation Technology Company) report [5] for this region showed that sites B and C have higher levels of pollutants when compared to site A (Table 1), and this could explain the increased mucus production seen in

specimens from site B (with the mucus providing protection against the pollutants). However, specimens from site C, the most polluted site studied here that had high concentrations of PAHs [5], did not show a similar increase in mucus production. This lack of alterations may reflect the fact that these specimens were collected from concrete pillars at a considerable distance above the substrate surface where there would be less contact with pollutants, since they are present in higher levels near the sediment or directly bound to its particles.

In a study of *Placopecten magellanicus*, Potter *et al.* [21] found that an elevated water temperature resulted in the exfoliation of epithelial cells as a consequence of increased cell turnover. In contrast, no exfoliation of epithelial cells caused by pollutants was seen here. Gregory *et al.* [10] studied the morphology of *P. perna* gill filaments exposed to different concentrations of mercury and found some alterations that included loss of abfrontal cilia and increase in the number of cilia on the lateral surface. These authors suggested that this increase in cilia was an attempt to enhance the circulation of water, thereby increasing the rate of filtration and gill oxygenation.

In conclusion, there were no significant morphological alterations in the gill morphology of bivalves from different sites of the Santos estuary. This lack of variation may reflect a long-term adaptation of these mollusks to chronic exposure to pollutants. The effects of acute exposure remain to be determined. The increased mucus production seen in bivalves from site B reflects the presence of pollutants near or directly bound to substrate particles and the absence of such alteration at site C shows that these response is related to the burrowing habit of specimens from site B that are more exposed to pollutants present at the sediment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Antonio Teruyoshi Yabuki and Mônica Iamonte for technical assistance and CAPES for financial support.

REFERENCES

1. Ballan-Dufrançais C, Jeantet AY, Coulon J (1990) Cytological features of mussels (*Mytilus edulis*) *in situ* exposed to an effluent of the titanium dioxide industry. *Ann. Inst. Océanogr.* **66**, 1-17.
2. Beninger PG, St-Jean SD (1997) The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. *Mar. Biol.* **129**, 389-397.
3. Beninger PG, St-Jean S, Possart Y, Ward JE (1993) Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **98**, 275-282.
4. Boffi AV (1979) *Moluscos Brasileiros de Interesse Médico e Econômico*. HUCITEC: São Paulo.
5. CETESB (2001) *Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. Relatório Técnico CETESB*. CETESB: São Paulo.
6. Depledge MH (1998) The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutat. Res.* **399**, 109-122.
7. Dufour SC, Beninger PG (2001) A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Mar. Biol.* **138**, 295-309.

8. Gold-Bouchot G, Simá-Alvarez R, Zapata-Pérez O, Güemez-Ricalde J (1995) Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostea virginica*) from Tabaco, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* **13**, 439-445.
9. Gregory MA, George RC (2000) The structure and surface morphology of gill filaments in the brown mussel *Perna perna*. *Zool. Afr.* **35**, 121-129.
10. Gregory MA, George RC, Marshall DJ, Anandraj A, McClurg TP (1999) The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Mar. Pollut. Bull.* **39**, 116-121.
11. Gregory MA, Marshall DJ, George RC, Anandraj A, McClurg TP (2002) Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. *Mar. Pollut. Bull.* **45**, 114-125.
12. Handy RD, Eddy FB (1989) Surface absorption of aluminum by gill tissue and body mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure. *J. Fish. Biol.* **34**, 865-874.
13. Jagoe CH, Haines TA (1997) Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. *Environ. Pollut.* **97**, 137-146.
14. Jones HD, Richards OG, Hutchinson S (1990) The role of ctenidial abfrontal cilia in water pumping in *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **143**, 15-26.
15. Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **11**, 137-140.
16. Masutti MB, Panitz CMN, Pereira NC (2002) Biodisponibilidade e bioconcentração de metais-traço no manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC). In: *Ecotoxicologia:*

Perspectivas para o Século XXI. (Espíndola ELG, Paschoal CM, Rocha O, Bohrer MB, Neto AO eds). pp. 207-219. RIMA: São Carlos.

17. Moore HJ (1971) The structure of the latero-frontal cirri on the gills of certain lamellibranch molluscs and their role in suspension feeding. *Mar. Biol.* **11**, 23-27.

18. Narchi W, Galvão-Bueno MS (1983) Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *Bol. Zool., Univ. S. Paulo.* **6**, 113-145.

19. Nicholson S, Lam PKS (2005) Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ. Int.* **31**, 121-132.

20. Owen G (1974) Studies on the gill of *Mytilus edulis*: the eu-latero-frontal cirri. *Proc. R. Soc. Lond.* **187**, 83-91.

21. Potter TM, MacDonald BA, Ward JE (1997) Exfoliation of epithelial cells by scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal variation and the effects of elevated water temperatures. *Mar. Biol.* **127**, 463-472.

22. Riisgard HU, Larsen PS, Nielsen NF (1996) Particle capture in the mussel *Mytilus edulis*: the role of laterofrontal cirri. *Mar. Biol.* **127**, 259-266.

23. Silvester NR (1988) Hydrodynamics of flow in *Mytilus* gills. *J. Exp. Mar. Biol Ecol.* **120**, 171-182.

24. Sunila I (1987) Histopathology of mussels (*M. edulis* L.) from Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Ann. Zool. Fenn.* **24**, 55-69.

25. Sunila I (1988) Acute histological responses of the gill of the mussel *Mytilus edulis* to exposure by environmental pollutants. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 137-141.

26. Tavares TM, Rocha VC, Porte C, Barceló D, Albaigés J (1988) Application of the Mussel Watch concept in studies of hydrocarbons, PCBs and DDT in the Brazilian Bay of Todos os Santos (Bahia). *Mar. Poll. Bull.* **19**, 575-578.
27. Torres MA, Testa CP, Gáspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, Almeida EA, Di Mascio P, Wilhelm Filho D (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* **44**, 923-932.
28. Wilson RW, Bergman HL, Wood CM (1994) Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminum in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2: Gill morphology, swimming performance and aerobic scope. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51**, 536-544.

Table 1. Data from CETESB report [5] showing pollutants concentrations in Santos estuary; shaded in grey, values considered above the Probable Effect Level (PEL).

	Analyzed substances	A	B	C	PEL
Heavy metals	As $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.65	4.50	3.83	41.6
	Cd $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.98	<0.05	1.38	4.21
	Pb $\mu\text{g.g}^{-1}$	26.33	15.00	219.66	112
	Cu $\mu\text{g.g}^{-1}$	20.33	12.00	39.33	108
	Cr $\mu\text{g.g}^{-1}$	34.33	36.33	56.00	160
	Mn $\mu\text{g.g}^{-1}$	232.66	208.66	967.66	-
	Hg $\mu\text{g.g}^{-1}$	0.40	0.70	0.66	0.696
	Ni $\mu\text{g.g}^{-1}$	19.66	12.33	25.00	42.8
	Zn $\mu\text{g.g}^{-1}$	60.00	55.66	698.33	271
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	Acenaphthene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0.51	5.40	21983.33	88.9
	Acenaphthylene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0.62	17	25000	128
	Anthracene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0.85	32.63	24133.33	245
	Benzo(a)anthracene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	12	54	27666.66	693
	Benzo(a)pyrene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	3.93	91.66	9500	763
	Chrysene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	8.6	58.33	28666.66	846
	Dibenz(a,h)anthracene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	<1.0	26	3983.33	135
	Phenanthrene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	8.4	8.33	39300	544
	Fluoranthene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	8.73	126.66	49000	1494
	Fluorene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.5	16.03	28666.66	144
	Naphthalene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	3.5	19.50	25320	391
	Pyrene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	6.73	96.66	37333.33	1398
	Total $\mu\text{g.kg}^{-1}$	37.46	620.73	320553.3	-
Solventes aromáticos	Benzene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.46	<1.00	<1.00	-
	Ethylbenzene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.06	<1.00	4.14	-
	op-Xilene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.73	<1.00	25.52	-
	m-Xilene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.30	<1.00	9.73	-
	Toluene $\mu\text{g.kg}^{-1}$	5.86	<1.00	<1.00	-
Polychlorinated biphenyls (PCB) $\mu\text{g.kg}^{-1}$		4.43	1.08	30.24	189
Organochlorine pesticides	Chloroform $\mu\text{g.kg}^{-1}$	23.20	<1.00	<1.00	-
	Alfa BHC $\mu\text{g.kg}^{-1}$	4.80	<1.00	<1.00	0.99
	Beta BHC $\mu\text{g.kg}^{-1}$	<1.0	<1.00	<1.00	0.99
	Delta BHC $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.4	<1.00	<1.00	0.99
	Gama BHC $\mu\text{g.kg}^{-1}$	2.8	<1.00	<1.00	0.99
Phenolic compounds	Phenol $\mu\text{g.kg}^{-1}$	33.33	104	633.33	-
	2-metilphenol $\mu\text{g.kg}^{-1}$	1.2	1.4	59	-
	3-metilphenol $\mu\text{g.kg}^{-1}$	<1.0	5.6	100	-
	4-metilphenol $\mu\text{g.kg}^{-1}$	25.33	10.26	823.33	-
	2-chlorophenol $\mu\text{g.kg}^{-1}$	3	<1.0	<1.00	-
	2,4-dimetilphenol $\mu\text{g.kg}^{-1}$	<1.0	<1.0	336.66	-

Legends

Figure 1. Map of the area studied showing the collection sites.

Figure 2. Abfrontal surface of the gill filaments of *M. falcata* from site A. **A.** General view showing the projections that connect the inner and outer lamellae (arrow). **B.** Detail of the ciliary disks (CD). **F** - filament, **IS** - interfilamentar space, **arrow** - simple cilia, **arrowhead** - composite cilia. Bars: 100 μm .

Figure 3. Lateral (**A,B**) and frontal (**C**) surface of a gill filament of *M. falcata* from site A. **D.** Detail of the marginal groove (**MG**) located in the ventral region of the filament. **CD** - ciliary disk, **FS** - frontal surface, **IS** - interfilamentar space, **LC** - lateral cilia, **LFC** - eu-latero-frontal cirri, **LS** - lateral surface, **M** - mucus. Bars: A, C and D = 100 μm , B = 10 μm .

Figure 4. Frontal surface of *Mytella falcata* gill filament. A, B. site B; C. site C. **FC** = frontal cilia; **FS** = frontal surface; **LFC** = eu-latero-frontal cirri; **M** = muçus. Bar = 0.1mm

Figure 1

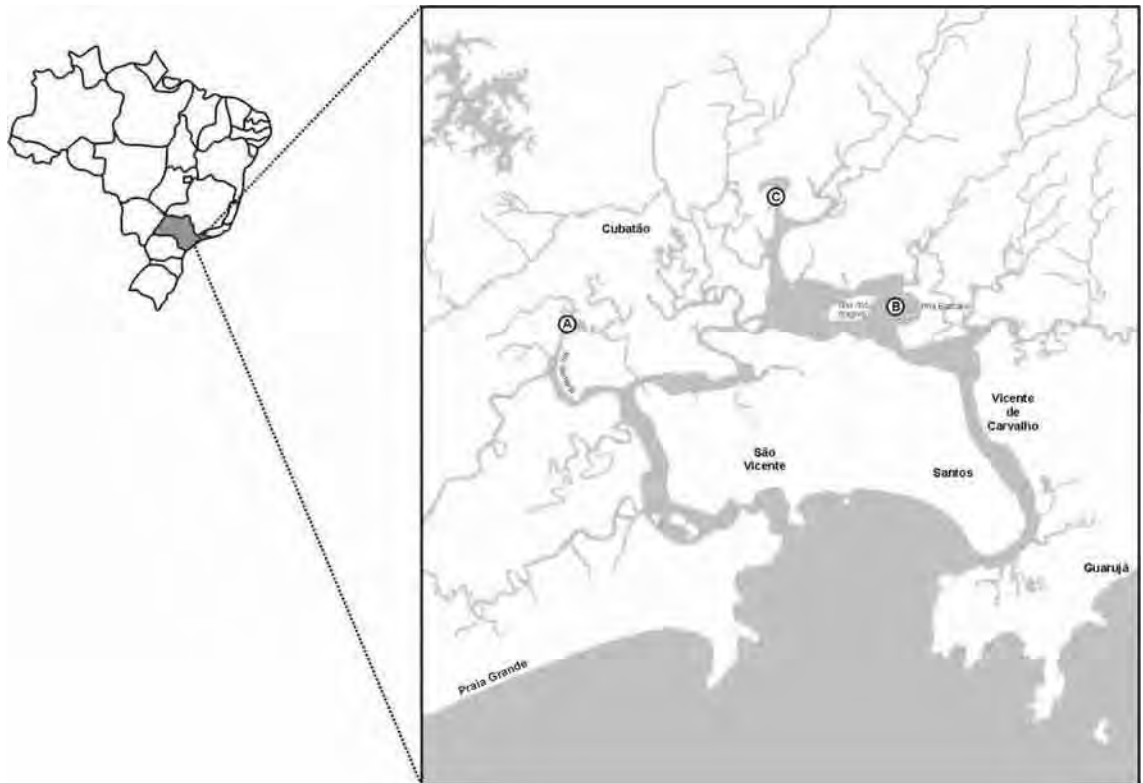


Figure 2

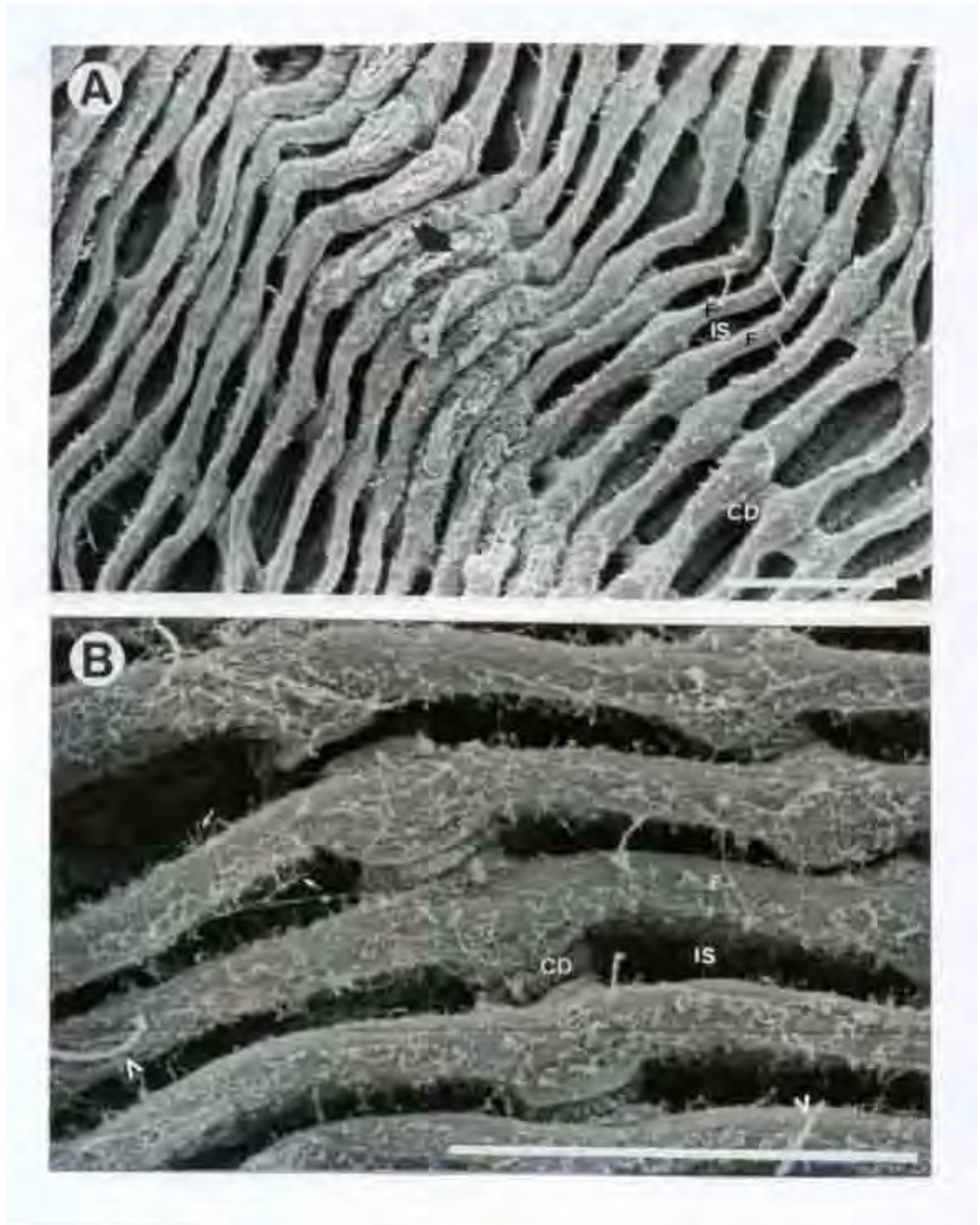


Figure 3

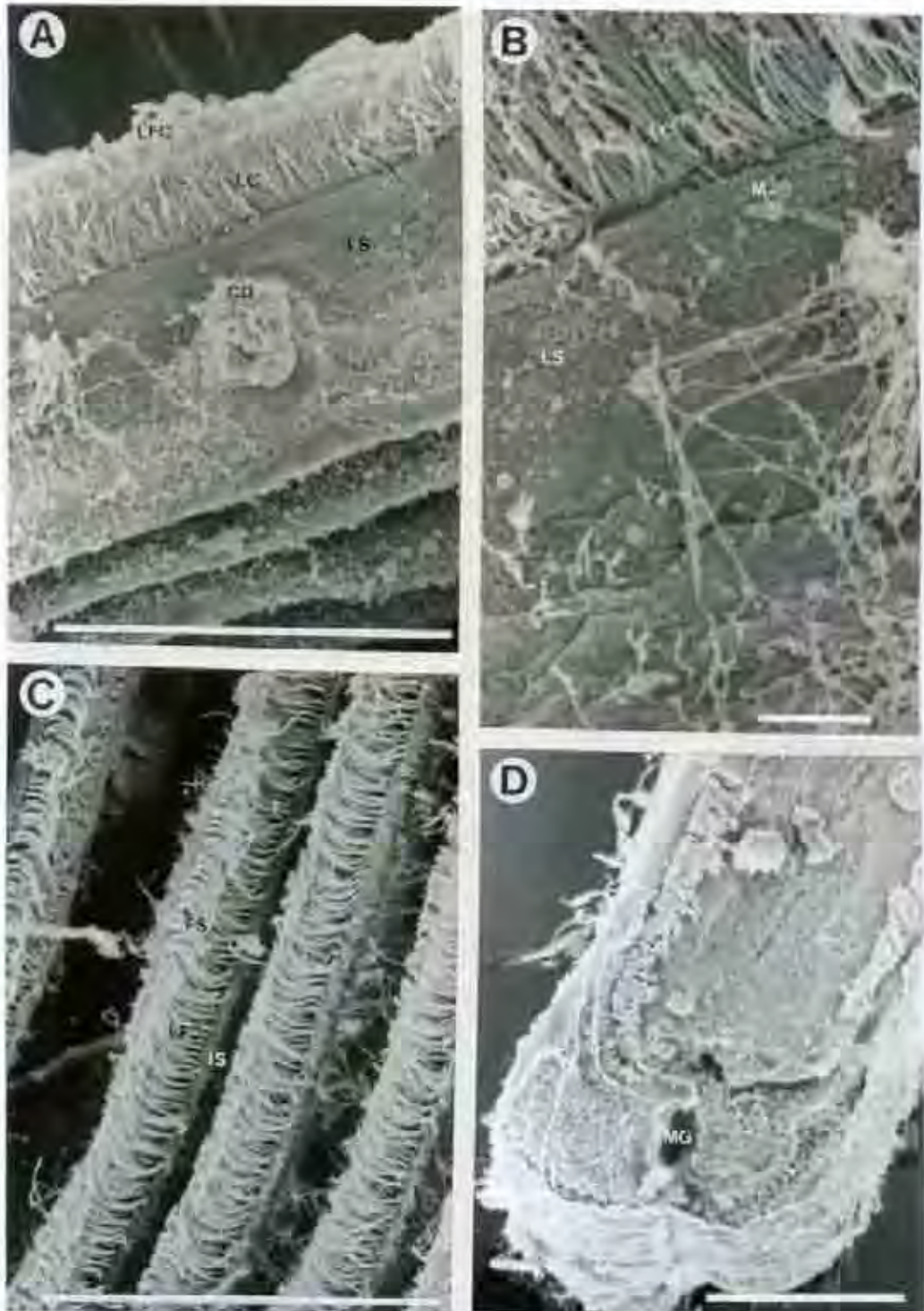
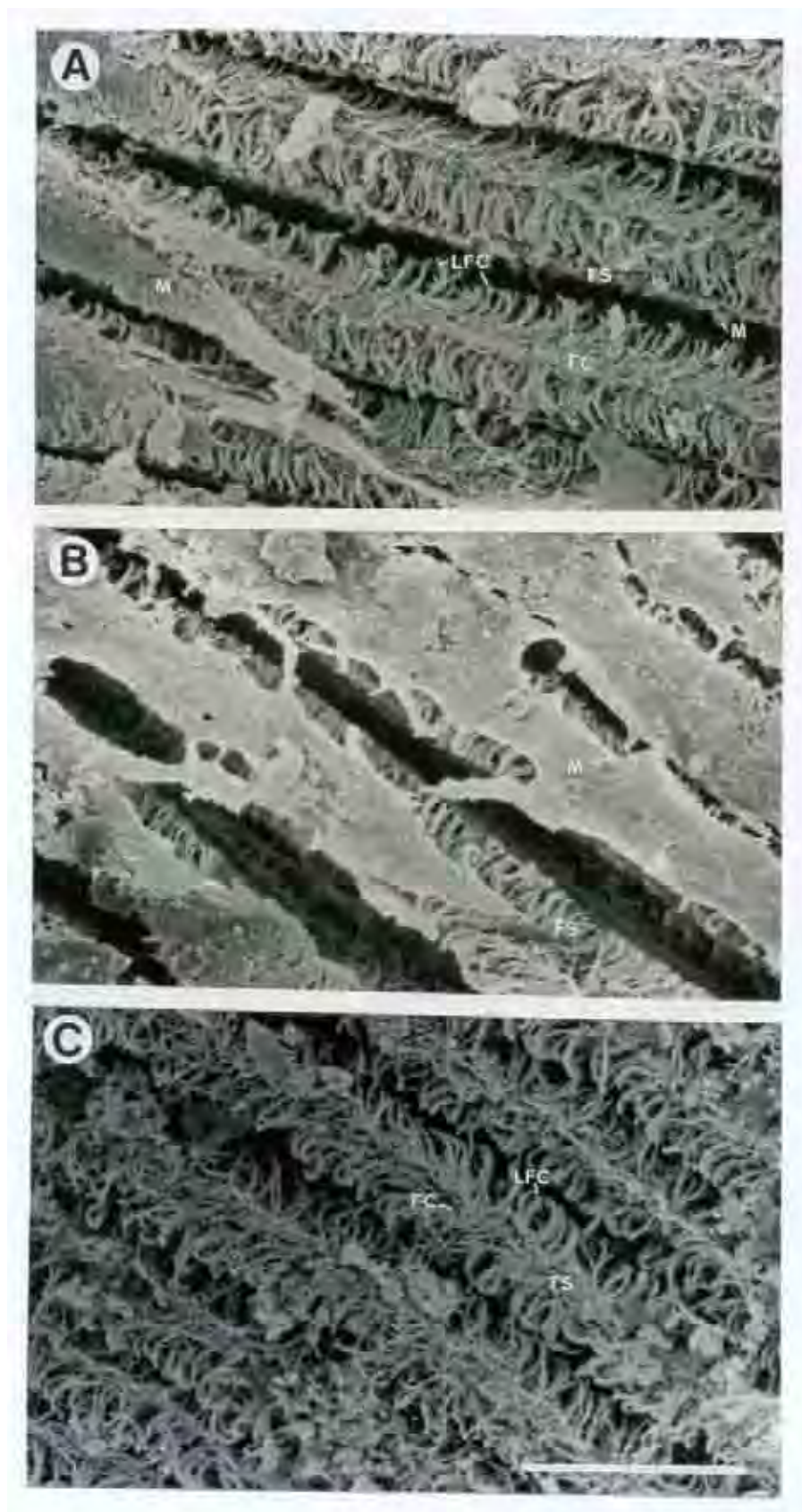


Figure 4



7.5. Caracterização histológica, histoquímica e ultra-estrutural dos filamentos branquiais de *Mytella falcata* (Bivalvia).

Este artigo será enviado para o periódico “Micron” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo

**Caracterização histológica, histoquímica e ultra-estrutural dos filamentos
branquiais de *Mytella falcata* (Bivalvia).**

José Augusto de Oliveira David*, Renato B. Salaroli, Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor para correspondências: Tel.: +55 19 35264135; fax: +55 19 35264136.

E-mail: zedavid@bol.com.br

RESUMO

Os bivalves filtradores são animais sésseis e vivem em constante contato com a água e os poluentes nela encontrados. A brânquia destes bivalves é um órgão muito exposto a essas condições devido a sua grande superfície e por estar relacionado com as trocas gasosas e a obtenção de alimento. O bivalve *Mytella falcata* encontra-se distribuído nas regiões estuarinas da América Latina, tanto na costa do Atlântico, como na do Pacífico. É amplamente consumida, sendo algumas vezes, a única fonte de proteínas de povoados pobres. Neste estudo, os filamentos branquiais de *Mytella falcata* foram analisados por meio de técnicas histológica, histoquímicas e sob o microscópio eletrônico de transmissão, a fim de caracterizá-los para futuros estudos comparativos de animais expostos a poluentes ambientais. Os filamentos branquiais podem ser divididos em regiões abfrontal, lateral e frontal. Os filamentos são conectados uns aos outros por discos ciliares e no centro do mesmo é encontrado um vaso de hemolinfa, por onde circulam hemócitos. Este vaso é sustentado por uma espessa lâmina basal e é revestido internamente por endotélio. A região abfrontal apresenta células cúbicas, enquanto a região lateral é formada por epitélio pavimentoso simples. A região frontal é constituída por cinco tipos de células colunares, sendo uma absorptiva, cuja maior característica é a presença de vesículas de pinocitose no ápice da célula, outra, secretora de rara ocorrência e três ciliadas que se diferenciam pelo tipo de ciliação. Todas as células que revestem o filamento apresentam numerosas microvilosidades e parecem absorver substâncias do meio. A análise histoquímica detectou a presença de células mucosas nas regiões frontal, lateral e abfrontal do filamento. A técnica de Azul de Bromofenol permitiu a diferenciação dos hemócitos e identificou uma secreção glicoproteica nas células secretoras da região frontal. As características encontradas aqui para os

filamentos branquiais de *Mytella falcata* foram muito similares a de outros bivalves, principalmente outros Mytilidae, sendo adequada para análises histopatológicas, onde facilmente se observa o efeito de poluentes solúveis em água.

PALAVRAS CHAVE: histologia, polissacarídeos, proteína, microscopia eletrônica de transmissão, brânquia, *Mytella falcata*

1. Introdução

O bivalve *Mytella falcata* é encontrado no litoral Atlântico, da Venezuela até a Argentina e também na costa do Pacífico e Ilhas Galápagos (Narchi e Galvão-Bueno, 1983). Considerado de grande importância alimentar é amplamente consumido em várias regiões do nordeste brasileiro, muitas vezes sendo a única fonte de proteína de alguns povoados mais pobres (Boffi, 1979). O gênero *Mytella* é de grande interesse em estudos de biomonitoramento, pois é encontrado semi-enterrado em regiões estuarinas, fornecendo dados sobre as condições do substrato (Narchi e Galvão-Bueno, 1983).

As brânquias dos bivalves suspensívoros são órgãos com grande superfície, que estabelecem correntes de água por movimentação de sua superfície ciliada. As brânquias de *Mytella falcata* são constituídas por dois ctenídeos, cada um formado por duas demibrânquias em forma de “V”. As demibrânquias são formadas por um conjunto de numerosos filamentos branquiais (David e Fontanetti, 2005). Por apresentar um epitélio simples com células bastante especializadas, os filamentos branquiais são adequados para análises histopatológicas, onde facilmente se observa o efeito de poluentes solúveis em água (Sunila, 1988).

Bernet et al. (1999), em estudo sobre peixes, afirmam que as brânquias e a pele são órgãos utilizados como marcadores primários para poluição aquática, pois apresentam grande superfície de contato direto e permanente com irritantes em potencial.

Neste estudo, caracterizou-se os filamentos de *Mytella falcata* por meio de técnicas histológicas, histoquímicas e ultra-estrutural (MET), com o intuito de fornecer dados que possam ser utilizados em futuros estudos de histopatologia, para detectar efeitos de poluentes nas brânquias destes bivalves, amplamente distribuídos nas regiões estuarinas brasileiras.

2. Materiais e métodos

Animais da espécie *Mytella falcata* foram coletados em uma área pouco impactada do estuário de Santos (Brasil) (23°55.052's; 46°26.975'W) e levados para o laboratório, onde foram mantidos em aquários de 5L com água do local de coleta.

2.1. Histologia

Cinco indivíduos foram dissecados e as brânquias fixadas em Paraformaldeído 4%. O material foi submetido a um banho em solução tampão fosfato por 24 horas e desidratado em concentração crescente de etanol. Em seguida, o material foi incluído em historesina JB4 e levados para a estufa à 37° C para polimerização. Os blocos obtidos foram seccionados com 5µm de espessura, em micrótomo Sorvall JB4 (Bio Rad) com navalha de vidro, e corados com hematoxilina e eosina segundo rotina histológica.

2.2. Histoquímica

O material fixado em Bouin aquoso seguiu a mesma rotina descrita acima e os cortes obtidos foram submetidos às reações histoquímicas para detecção de polissacarídeos – PAS (Junqueira e Junqueira, 1983) e para a detecção de proteínas totais – Azul de Bromofenol (Pearse, 1985).

2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Pequenos fragmentos das brânquias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M a 4°C e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material foi contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas, desidratado em série crescente de acetona, incluído em Epon-araldite com catalisador por 24 horas e então incluído na mesma resina por 24 horas em estufa a 70°C. O material foi observado ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100 e fotografado.

3. Resultados

Os filamentos branquiais de *Mytella falcata* são interligados por discos ciliares. Estes discos são formados por células colunares ciliadas, sendo que os cílios das células de um filamento se intercalam com os cílios das células do filamento seguinte, fazendo então, a conexão entre eles (Figura 1A).

O filamento pode ser dividido em região frontal, região lateral e região abfrontal (Figura 1B). A região frontal diferencia-se das demais regiões por apresentar células ciliadas (Figura 1B, D).

O filamento apresenta um vaso de hemolinfa localizado em sua porção central (Figuras 1A-C); este vaso é revestido internamente por um endotélio, constituído por células que apresentam núcleos bastante achatados com parte da cromatina condensada e disposta, principalmente, na periferia do núcleo; em seu citoplasma são vistas mitocôndrias e complexo de Golgi bem desenvolvido (Figura 2A).

A região lateral é formada por um epitélio pavimentoso simples (Figura 1C); as células que compõem este epitélio possuem núcleo achatado e inúmeras microvilosidades em sua superfície apical (Figura 2B); próximo à superfície da célula, são encontradas várias vesículas (cabeça de seta na Figura 2B e no detalhe); estas também estão presentes nas células da região abfrontal (cabeça de seta na Figura 3C). Unindo todas as células que recobrem os filamentos branquiais, são encontradas junções adesivas e junções septadas (Figura 2C).

Entre o epitélio e o endotélio observa-se uma estrutura que confere sustentação ao vaso e à brânquia e cora-se moderadamente pela técnica de PAS (asterisco na Figura 4A); ao MET, esta estrutura apresenta elementos fibrosos (Figuras 2A, B, 3A, C), denominada neste estudo como lâmina basal.

Dentro do vaso de hemolinfa é comum a presença de hemócitos, que podem ser diferenciados em: granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos são fortemente corados com a eosina (Figura 1C) e pelo Azul de bromofenol (Figura 4B), evidenciando a presença de grânulos protéicos em seu citoplasma. Observados ao MET, os granulócitos apresentam vários vacúolos digestivos com figuras mielínicas (Figura 3A). Os agranulócitos coram-se fracamente pela eosina e pelo Azul de bromofenol (Figura 4B). Os hemócitos são capazes de atravessar a lâmina basal (Figura 3A) e alcançar o epitélio branquial em qualquer porção do filamento. Feixes nervosos (Figura 3B) são

encontrados próximos à lâmina basal, principalmente nas regiões abfrontal e frontal do filamento.

A região abfrontal é constituída por células cúbicas com núcleos arredondados (Figura 1C); estas células apresentam inúmeras microvilosidades em sua superfície e poucos cílios (Figura 3C). Foram observadas também nesta região, células secretoras de muco, coradas fortemente com a técnica de PAS (Figura 4A). Estas células apresentam grânulos de diferentes tamanhos e eletrondensidades (Figura 3C). As células mucosas também podem ser observadas na região lateral e frontal do filamento, porém em menor número (Figura 4A).

A região frontal apresenta cinco tipos de células; duas delas não apresentam cílios em sua superfície (célula absorptiva e célula secretora), as outras três são caracteristicamente diferenciadas pelo tipo de ciliação (célula frontal, célula eu-latero-frontal e célula lateral) (Figura 1D).

As células ciliadas são colunares e apresentam grande número de mitocôndrias logo abaixo dos corpúsculos basais dos cílios (Figura 5A-C); essa região é facilmente visualizada quando aplicado o Azul de Bromofenol (cabeça de seta na Figura 4B). Entre as mitocôndrias, podemos observar as raízes dos cílios, estruturas estriadas compostas por microtúbulos que seguem desde os corpúsculos basais até a região próxima ao núcleo da célula; observa-se ainda, em todas as células ciliadas, a presença de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi; o núcleo (Figura 5A, C) é grande e ovalado. As células eu-latero-frontais e frontais apresentam um maior desenvolvimento do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso, quando comparadas com as células laterais; estas, por sua vez, possuem mitocôndrias maiores e em maior número em relação às demais (Figura 5B). Todas as células da região frontal apresentam

inúmeras microvilosidades em sua superfície e em seu citoplasma são encontrados corpos multivesiculares e vacúolos digestivos (Figura 5); estas estruturas encontram-se em menor número nas células laterais (Figura 5B).

As células absorptivas (Figura 5D) não apresentam cílios; em sua superfície livre, inúmeras microvilosidades foram observadas e, na região apical, várias vesículas de pinocitose; estas vesículas são formadas na base das microvilosidades (setas na Figura 5D). O núcleo é alongado e apresenta a cromatina bem descondensada; estas células se localizam entre as células laterais e as células eu-latero-frontais (Figura 1D).

As células secretoras são raras e estão localizadas entre as células frontais; são detectadas tanto pela técnica de PAS (seta na Figura 4A) como pelo azul de bromofenol (seta na Figura 4C); isso nos leva a concluir que se trata de uma secreção glicoproteica, sendo esta diferente da secreção das células mucosas.

4. Discussão

A estrutura dos filamentos branquiais de bivalves e outros organismos filtradores foi objetivo de investigações científicas no final do século XIX e início do século XX (Peck, 1877; Fawcett e Porter, 1954; Gibbons, 1961; Moore, 1971; Owen, 1974). Nestes estudos, muito foi descoberto e descrito sobre a estrutura e movimentação do cílios, porém pouca atenção foi dada sobre a estrutura e função de outros componentes e tipos celulares deste órgão. Além disso, após estes trabalhos, observou-se um grande avanço no estudo da função de algumas estruturas celulares o que auxiliou na melhor compreensão do funcionamento dos filamentos branquiais.

Os filamentos branquiais da espécie *Mytella falcata* foram estudados por Narchi e Galvão-Bueno (1983) sob microscopia de luz, que descreveram a morfologia geral do

filamento sem detalhar a estrutura das células que formam os mesmos. David e Fontanetti (2005) descreveram a morfologia da superfície branquial da mesma espécie, sob microscopia eletrônica de varredura. O presente estudo é o primeiro a utilizar técnicas histoquímicas e ultra-estrutural para análise dos filamentos branquiais de *Mytella falcata*.

A forma e distribuição dos cílios presentes na região frontal, observadas no presente estudo, são muito similares às observadas em outras espécies. Estes cílios têm papel fundamental na captura e transporte de partículas, durante o processo de obtenção de alimentos e, portanto, parecem estar bastante conservados dentro do grupo (Moore, 1971; Owen, 1974; Jorgensen, 1996; Gregory e George, 2000).

O movimento dos cílios é dependente de ATP e as mitocôndrias são as organelas capazes de transformar a energia dos nutrientes para ATP servindo como fonte de energia para a movimentação ciliar. Neste estudo, notamos maior número de mitocôndrias nas células laterais, sendo estas de maior tamanho; este fato pode estar relacionado à função destas células na superfície do filamento branquial. Segundo Owen (1974), as células laterais são as grandes responsáveis pela movimentação da água no interior do corpo dos bivalves fazendo com que esta passe pelo espaço entre dois filamentos. Por outro lado, Jones et al. (1990) afirma que esta função, em *Mytilus edulis*, deve ser dividida com os cílios encontrados na superfície abfrontal. No presente estudo e em estudo prévio (David e Fontanetti, 2005), não foram detectados cílios abfrontais em número suficiente para gerar forças de movimentação de água em *Mytella falcata*.

O citoplasma das células laterais foi o que apresentou menor número de organelas, com exceção das mitocôndrias que aparecem em grande número; em sua

superfície foram encontradas poucas microvilosidades. Este fato pode estar ligado a alta especialização destas células que voltam sua função principalmente para a movimentação da água no interior do corpo dos organismos, tendo vital importância para a sobrevivência dos animais. Os outros tipos celulares, tanto da região frontal como das outras regiões do filamento, apresentam em seu citoplasma pequenas vesículas de pinocitose que refletem o caráter absorptivo de todo o epitélio branquial.

Fawcett e Porter (1954) discutem a presença e a função das microvilosidades, uma vez que estudos anteriores não haviam detectado estas estruturas, afirmando apenas a presença de uma “cutícula” de característica gelatinosa cobrindo o epitélio branquial. Fawcett e Porter (1954) sugerem que as microvilosidades serviriam de apoio mecânico para uma substância mucosa amorfa e que juntas, microvilosidades e substância amorfa, serviriam como uma forma de fortalecer a ancoragem dos cílios nas células. Por outro lado, Junqueira e Carneiro (2005) afirmam que a função das microvilosidades está ligada à absorção de substâncias do meio para o interior das células, uma vez que aumentam a superfície da mesma.

Em nossos estudos, quando aplicada a técnica de PAS, notamos a presença de marcação moderada na superfície de todo o epitélio branquial (Figura 4A). Se levarmos em conta os dados citados por Fawcett e Porter (1954), poderíamos concluir que as microvilosidades podem ajudar na manutenção de uma camada de muco por todo epitélio do filamento, cuja função poderia ser tanto a proteção contra agentes potencialmente danosos para as células, como ponto de ligação para partículas que seriam ingeridas. Na análise ultra-estrutural é clara a formação de vesículas de pinocitose na base das microvilosidades das células absorptivas (Figura 5D), o que mais uma vez certifica a função absorptiva de tais estruturas.

Já nas células laterais e abfrontais, as vesículas observadas na região apical da célula parecem secretar uma substância mais protéica do que mucosa; portanto esta secreção deve ter uma função específica que ainda precisa ser esclarecida.

A estrutura de sustentação do vaso de hemolinfa foi observada por outros autores, mas sua constituição e função não é bem definida, sendo considerada pela maioria dos autores como uma estrutura quitinosa (Peck, 1877; Gregory et al., 2002). No presente estudo, as características observadas através da coloração histoquímica de PAS e da análise ultra-estrutural, demonstram que tal estrutura apresenta polissacarídeos associadas a fibras colágenas, formando assim a lâmina basal compartilhada pelo endotélio e epitélio. Foi observado também que os hemócitos são capazes de atravessar esta estrutura, o que confirma se tratar de uma lâmina basal espessada, uma vez que os hemócitos não são capazes de atravessar estruturas quitinosas.

As lâminas basais formam uma malha que tem função de filtro de carga aniônica e seus componentes são produzidos pelas células epiteliais e endoteliais que nela se apoiam (Junqueira e Carneiro, 2005). As organelas encontradas aqui, nas células do epitélio e endotélio condizem com estes dados, uma vez que estas apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos. O fato desta estrutura apresentar-se bastante espessada pode estar relacionada a alta fricção que sofre em relação a água que circula constantemente entre o espaço interfilamentar, geraria um alto atrito entre as células.

As junções que ligam os diferentes tipos celulares do filamento branquial de *Mytella falcata* são estruturas comuns em invertebrados e apresentam funções e características morfológicas próprias. A junção adesiva entre as células forma um anel

que circunda toda a célula e funciona como um ponto de ligação para a rede do citoesqueleto, aumentando a rigidez do bordo em escova. As junções septadas também formam um anel por toda a célula e apresentam função de oclusão, não permitindo a passagem de material do meio pelo espaço intercelular, e função de comunicação e adesão entre as células do tecido (Satir e Gilula, 1970).

5. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, ao CNPq e à FUNDUNESP pelo suporte financeiro, à “Náutica da Ilha” e Márcia M. Hoshina pela ajuda nas coletas, à Cristiane M. Mileo, pelas ilustrações e à Gerson Mello Souza, Monika Iamonte e Antonio T. Yabuki pela ajuda na execução das técnicas.

6. Referências bibliográficas

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34.

Boffi, A.V., 1979 Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico. HUCITEC, São Paulo.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos Estuary. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22, 203-210.

Fawcett, D.W., Porter, K.R., 1954. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *Journal of Morphology* 94, 221-281.

Gibbons, L.R., 1961. The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *Journal of Biophysic, Biochemistry and Cytology* 11, 179-205.

Gregory, M.A., George, R.C., 2000. The structure and surface morphology of gill filaments in the brown mussel *Perna perna*. *Zoologica Africana* 35, 121-129.

Gregory, M.A., Marshall, D.J., George, R.C., Anandraj, A., McClurg, T.P., 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. *Marine Pollution Bulletin* 45, 114-125.

Jones, H.D., Richards, O.G., Hutchinson, S., 1990. The role of ctenidial abfrontal cilia in water pumping in *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 143, 15-26.

Jorgensen, C.B., 1996. Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series* 142, 287-302.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2005. *Biologia Celular e Molecular*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Junqueira, L.C.U., Junqueira, M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora Santos, São Paulo.

Moore, H.J., 1971. The structure of the latero-frontal cirri on the gills of certain lamellibranch molluscs and their role in suspension feeding. *Marine Biology* 11, 23-27.

Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S., 1983. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *Bolm. Zool., Univ. S. Paulo* 6, 113-145.

Owen, G., 1974. Studies on the gill of *Mytilus edulis*: the eu-latero-frontal cirri. *Proceedings of the Royal Society of London* 187, 83-91.

Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemical: Theoretical and Applied*. Churchill.

Peck, F.L.S., 1877. The minute structure of the gills of lamellibranch mollusca. *Quarterly Journal of Microscopic Sciences* 65, 43-66.

Satir, P., Gilula, N.D., 1970. The cell junction in a lamellibranch gill ciliated epithelium: Localization of pyroantimonate precipitate. *Journal of Cell Biology* 47, 468-487.

Sunila, I., 1988. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *Journal of Invertebrate Pathology* 52, 137-141.

LEGENDAS

Figura 1. Cortes histológicos dos filamentos branquiais de *Mytella falcata*. **A.** vista geral dos filamentos branquiais com os discos ciliares; **B.** vista de um filamento branquial evidenciando as regiões do filamento e o vaso de hemolinfa; **C.** detalhe do vaso de hemolinfa e da região abfrontal; **D.** detalhe da região frontal do filamento. cf = células frontais; clf = células eu-latero-frontais; cl = células laterais; dc = discos ciliares; end = endotélio; ep = epitélio; g = granulócito; ra = região abfrontal; rf = região frontal; rl = região lateral; v = vaso de hemolinfa. Barra em A = 20 μ m e em B, C, D = 10 μ m

Figura 2. Micrografias eletrônicas da região lateral do filamento branquial de *Mytella falcata*. **A.** célula do endotélio; **B.** célula do epitélio; em detalhe, vesícula de exocitose; **C.** detalhe das junções encontradas entre todas as células que formam a superfície branquial. cg = complexo de Golgi; end = endotélio; ep = epitélio; ja = junção adesiva; js = junção septada; lb = lâmina basal; mv = microvilosidades; n = núcleo; rer = retículo endoplasmático rugoso; v = vaso de hemolinfa; cabeças de setas = vesícula de exocitose. Barra em A e B = 3 μ m e no detalhe e C = 0,3 μ m

Figura 3. Micrografias eletrônicas do filamento branquial de *Mytella falcata*. **A.** detalhe de um granulócito atravessando a lâmina basal; **B.** detalhe de um feixe nervoso; **C.** detalhe da região abfrontal evidenciando uma célula mucosa. cm = célula mucosa; ep = epitélio; fn = feixe nervoso; g = granulócito; lb = lâmina basal; mv = microvilosidades; n = núcleo; v = vaso de hemolinfa; vd = vacúolo digestivo; seta = cílio; cabeças de setas = vesícula de exocitose. Barra em A e B = 1 μ m e em C = 3 μ m

Figura 4. Filamentos branquiais de *Mytella falcata* submetidos às técnicas histoquímicas de PAS (A) e Azul de Bromofenol (B e C). **A.** vista geral dos filamentos branquiais evidenciando a posição das células mucosas (fortemente coradas) e da membrana basal; **B.** notar a forte marcação protéica na região dos corpúsculos basais e nos granulócitos, enquanto os agranulócitos são fracamente corados; **C.** detalhe da região frontal evidenciando uma célula secretora com grânulos corados com Azul de Bromofenol. a = agranulócito; g = granulócito, ra = região abfrontal; rf = região frontal; rl = região lateral; v = vaso de hemolinfa; * = lâmina basal; setas = célula secretora da região frontal; cabeça de seta = corpúsculos basais. Barras = 30µm

Figura 5. Micrografias eletrônicas das células da região frontal do filamento branquial de *Mytella falcata*. **A.** células eu-latero-frontais; **B.** célula lateral; **C.** célula frontal; **D.** célula absorptiva. cb = corpúsculo basal; cg = complexo de Golgi; m = mitocôndria; mv = microvilosidade; n = núcleo; rer = retículo endoplasmático rugoso; vp = vesículas de pinocitose; * = corpos multivesiculares e vacúolos digestivos; seta = formação de vesículas de pinocitose. Barras = 3µm

Figura 1

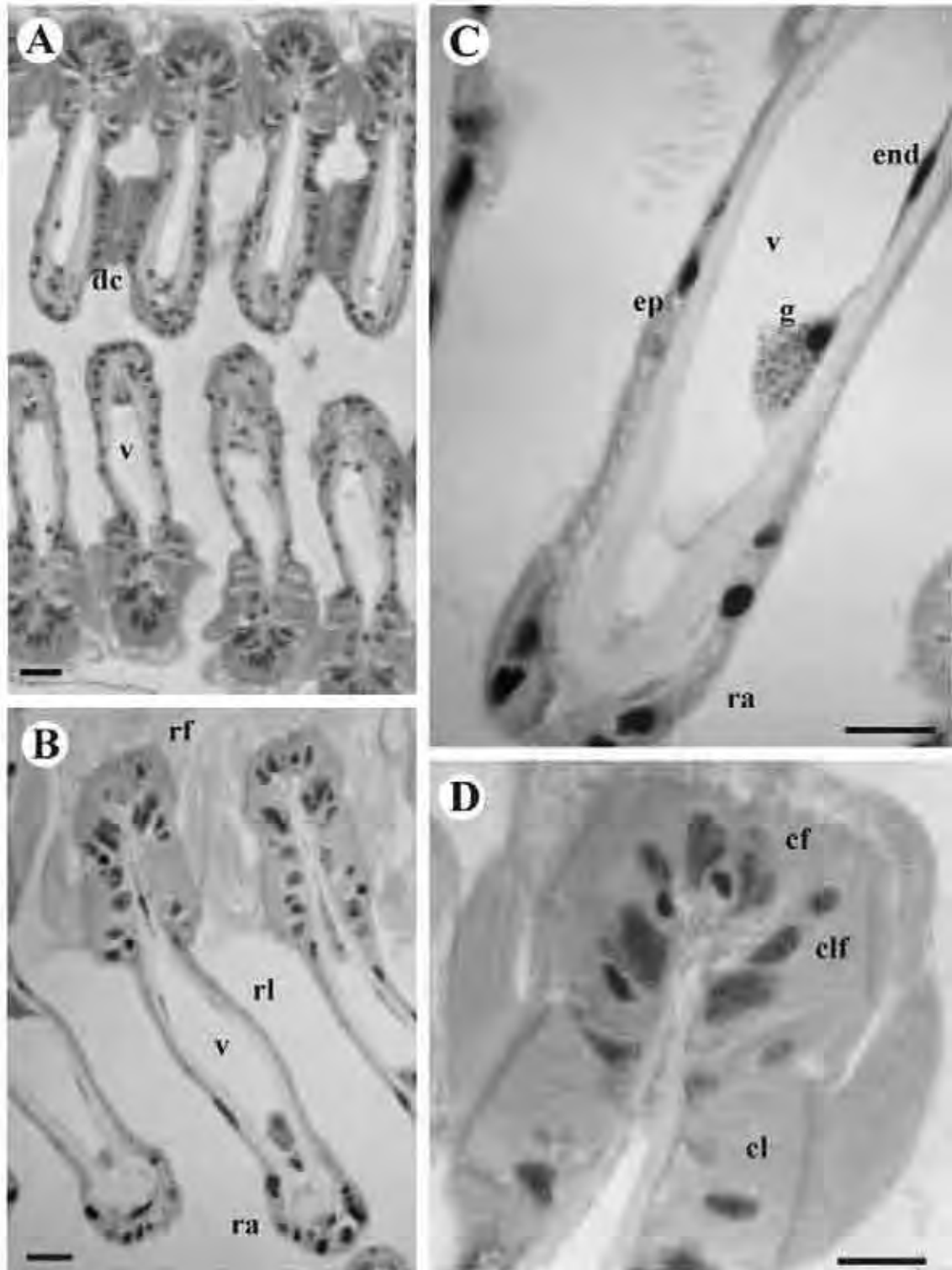


Figura 2

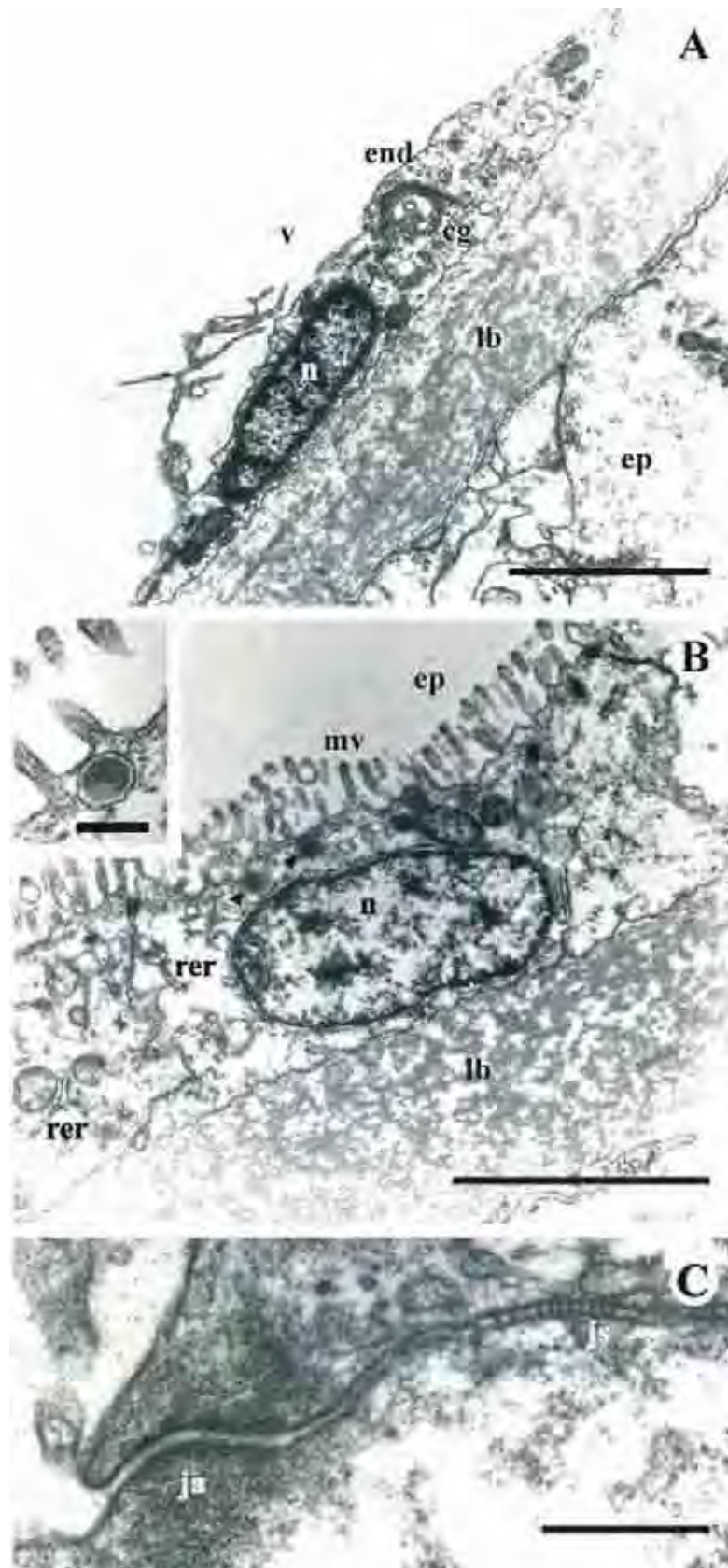


Figura 3

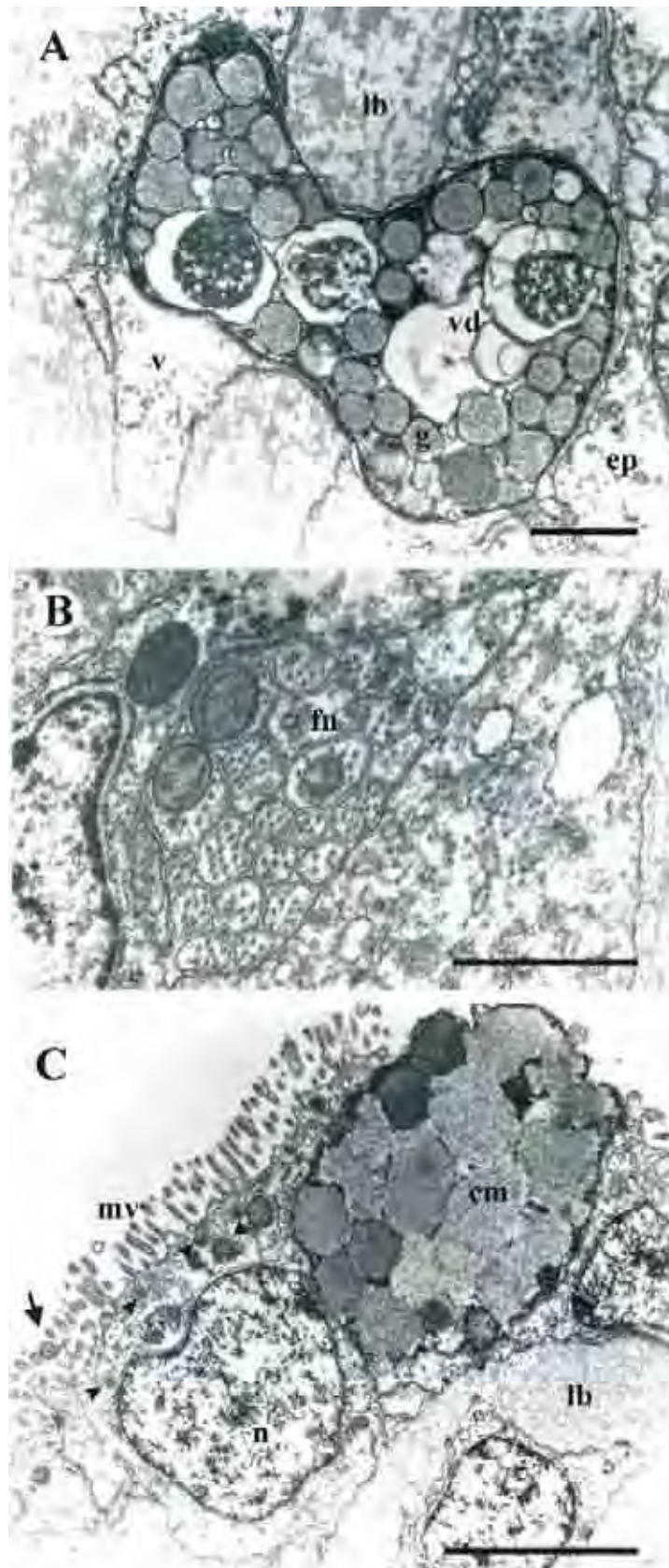


Figura 4

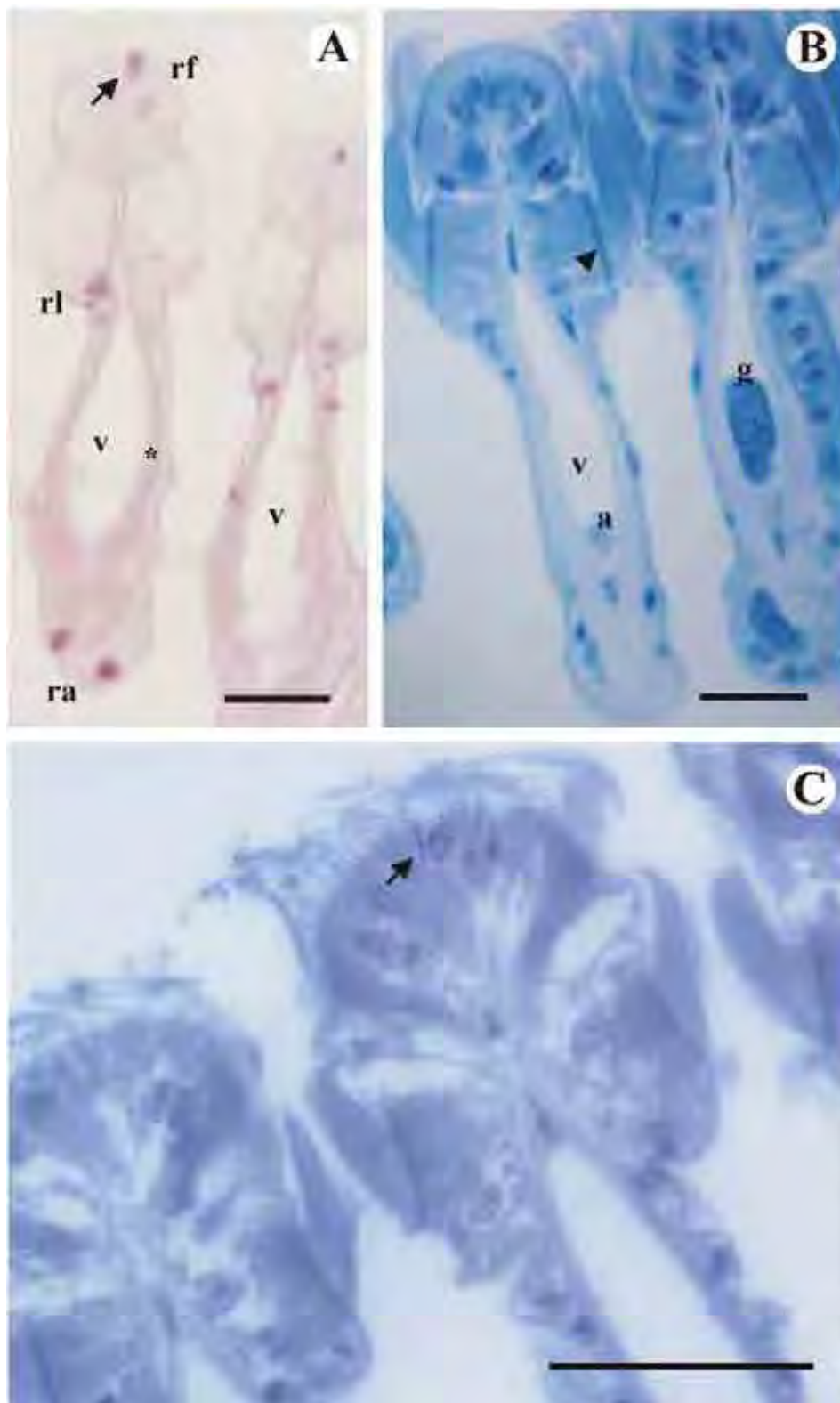
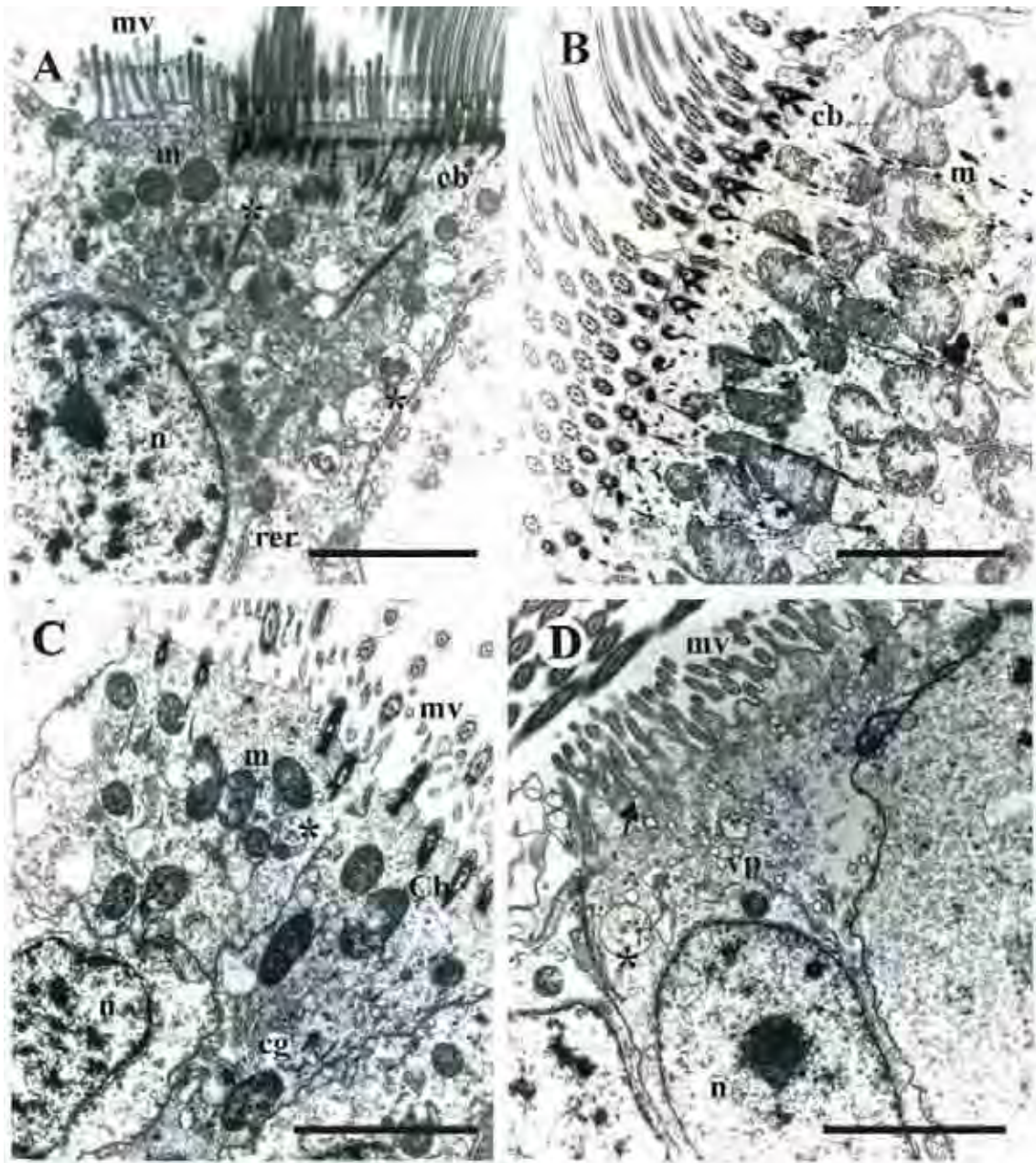


Figura 5



7.6. Histopatologia dos filamentos branquiais de *Mytella falcata* provenientes do estuário de Santos.

Este artigo será enviado para o periódico “Environmental Pollution” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo.

Histopatologia dos filamentos branquiais de *Mytella falcata* provenientes do estuário de Santos.

José Augusto de Oliveira David*, Renato B. Salaroli, Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor para correspondências: Tel.: +55 19 35264135; fax: +55 19 35264136.

E-mail: zedavid@bol.com.br

Resumo

A região da Baixada Santista é considerada um pólo turístico e um pólo industrial com população de cerca de 1,5 milhão de habitantes, estas características tornam a localidade sujeita ao aporte de poluentes produzidos pelas atividades ali desenvolvidas. Diante destes fatores, um constante monitoramento ambiental na região é de grande importância para a manutenção de um perfeito funcionamento de todo o ecossistema. Este trabalho teve como objetivo analisar a morfologia dos filamentos branquiais de *Mytella falcata*, um bivalve tropical de águas estuarinas, provenientes de três pontos do estuário de Santos com diferentes graus de degradação ambiental, a fim de identificar possíveis alterações. Para isso, foram utilizadas técnicas de histologia, histoquímica e ultra-estrutura. Os animais do ponto A mantiveram a estrutura dos filamentos intacta, enquanto nos pontos B e C foram encontradas algumas alterações como: desprendimento do epitélio da região lateral, alterações morfológicas neste mesmo epitélio, aumento no número de células mucosas e processos de inflamação e proliferação celular. Concluiu-se que tais alterações mostram uma tentativa de impedir a entrada de poluentes, evitando que estes alcancem o resto do organismo, e também, que se a renovação celular ocorrer de forma desordenada, alterações mais sérias e irreversíveis, como a hiperplasia dos filamentos, podem ser encontradas.

Palavras-chave: filamentos branquiais, histopatologia, poluentes, renovação celular

Introdução

A região da Baixada Santista no estado de São Paulo (Brasil) está localizada em uma faixa do litoral densamente povoada e industrializada. A região abriga o pólo

petroquímico de Cubatão com indústrias siderúrgicas, refinarias e indústrias de fertilizantes e o Porto de Santos, considerado o mais importante da América Latina. Além disso, a região é considerada um pólo turístico e tem sua população de cerca de 1,5 milhão de habitantes dobrada na época de verão. Todas essas características tornam esta localidade constantemente sujeita ao aporte de poluentes produzidos pelas atividades ali desenvolvidas.

A região, na década de 70, foi considerada um exemplo de poluição ambiental; porém, depois de uma série de medidas tomadas pelos órgãos competentes, apresenta um quadro muito melhor, apesar dos sedimentos da região continuarem como depósito de uma variedade de poluentes como metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (CETESB, 2001).

O impacto de poluentes em um organismo é percebido através de perturbações em diferentes níveis de complexidade funcional. A estrutura das brânquias dos bivalves é adequada para análises histopatológicas, já que é formada por um epitélio simples, composto de uma variedade de tipos celulares, onde facilmente se observa os efeitos de poluentes solúveis em água (Sunila, 1988); além disso, este órgão apresenta importante papel nas trocas iônicas e na obtenção de alimentos.

A espécie *Mytella falcata* é encontrada formando grandes bancos nos sedimentos do estuário de Santos; estes bivalves sésseis e filtradores, estão constantemente expostos às condições ambientais e, por estarem semi-enterrados nos sedimentos altamente contaminados da região, podem ser considerados como excelentes organismos-teste para estudos de monitoramento ambiental.

Desta forma, este trabalho analisou as brânquias de indivíduos da espécie *Mytella falcata* coletados em três pontos do estuário de Santos com diferentes graus de

contaminação, a fim de detectar possíveis mudanças no epitélio branquial e inferir sobre as condições da população local de mexilhões.

Materiais e métodos

Material

Indivíduos da espécie *Mytella falcata* com aproximadamente 4,0 cm de comprimento foram coletados juntamente com a água dos respectivos pontos de coleta e levados até o laboratório, onde foram acomodados em aquários com 5 litros de água dos pontos de coleta com aeração constante por 24 horas. Este procedimento foi adotado a fim de minimizar os danos causados pelo estresse da coleta e do transporte dos animais. As análises histológicas e histoquímicas foram realizadas em 19 indivíduos do ponto A, 20 do ponto B e 13 do ponto C coletados de maio de 2004 a fevereiro de 2006, enquanto a análise ultra-estrutural foi conduzida em 15 animais de cada ponto, coletados de outubro de 2005 a agosto de 2006.

Pontos de Coleta

Os pontos de coleta aqui analisados foram escolhidos devido a abundância de exemplares de *Mytella falcata* nos mesmos; além disso, estes pontos foram previamente estudados (CETESB, 2001), o que nos forneceu dados das características ambientais e dos poluentes neles presentes. Os três pontos são canais estuarinos que sofrem a influência das marés e possuem águas salobras.

O ponto A (23°55.052'S, 46°26.975'W) está localizado em uma região menos impactada por despejos industriais. O ponto B (23°54.659'S, 46°20.464'W) (Largo do Canéu) sofre influência do porto de Santos e, segundo Kummrow et al. (2006), o

despejo de esgoto doméstico é a única fonte identificada de poluição. O ponto C (23°52.597'S, 46°22.583'W) localiza-se em frente a uma grande siderúrgica, é a área mais contaminada e recebe despejos da siderúrgica e de esgoto e, segundo Kummrow et al. (2006) as concentrações de HPA podem alcançar 347.55 µg/g de sedimento (peso seco). Na Tabela 1 estão resumidos os dados obtidos para os sedimentos da região em coletas de 1998 e 1999 realizadas pela CETESB retirados do relatório de 2001 sobre o sistema estuarino de Santos e São Vicente (CETESB, 2001). A análise da água nessas regiões não demonstrou concentrações de poluentes superiores às estabelecidas pela legislação pertinente (CETESB, 2001).

Histologia

Fragmentos das brânquias foram retirados e fixados em Paraformaldeído 4%. O material foi submetido a um banho em solução tampão fosfato por 24 horas e desidratado em concentração crescente de etanol. Em seguida, o material foi incluído em historesina JB4 e levados para a estufa à 37° C para polimerização. Os blocos obtidos foram seccionados com 5 µm de espessura, em micrótomo Sorvall JB4 (Bio Rad) com navalha de vidro, e corados com hematoxilina e eosina segundo rotina histológica.

Histoquímica

O material fixado em Bouin aquoso seguiu a mesma rotina descrita acima e os cortes obtidos foram submetidos às reações histoquímicas para detecção de polissacarídeos – PAS (Junqueira e Junqueira, 1983) e para a detecção de proteínas totais – Azul de Bromofenol (Pearse, 1985).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Pequenos fragmentos das brânquias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M a 4°C e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material foi contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas, desidratado em série crescente de acetona, incluído em Epon-araldite com catalisador por 24 horas e então incluído na mesma resina por 24 horas em estufa a 70°C. Os blocos foram seccionados e colocados em tela para contrastação e observação ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100.

Resultados

Os filamentos branquiais dos animais do ponto A apresentaram sua morfologia preservada como descrito por David et al. (artigo 5) (Figura 2A). Os animais dos pontos B e C apresentaram como alterações mais comuns, o desprendimento do epitélio branquial, nas regiões abfrontal e lateral (Figura 2B), e a alteração das células do epitélio da região lateral, originalmente pavimentosas, tornando-se cúbicas (Figura 2C). Outras alterações menos freqüentes foram o aumento do número de hemócitos no vaso de hemolinfa, que chegaram a deformar o filamento branquial (Figura 2D) e a invasão de hemócitos no epitélio lateral e abfrontal, que atravessaram a lâmina basal (seta na Figura 2E). A hiperplasia do filamento branquial (seta na Figura 2F) foi encontrada raramente.

Pela técnica de azul de bromofenol foi possível demonstrar, na região abfrontal de alguns indivíduos dos pontos B e C, uma desorganização do epitélio e a presença de muitos grânulos protéicos (Figuras 3A, B); a estrutura parece dilatada, com grande

número de granulócitos. Na região frontal, esta mesma técnica detectou maior frequência, nos animais dos pontos B e C, de células com secreção protéica entre as células frontais ciliadas (seta na Figura 3C). Estas células também foram coradas pela técnica de PAS (seta na Figura 3D) evidenciando uma secreção glicoproteica. A técnica de PAS demonstrou também um aumento na presença de células mucosas em todas as regiões do filamento dos animais dos pontos B e C.

A análise ultra-estrutural da região lateral e abfrontal dos filamentos dos animais dos pontos B e C, comparada com a observada no ponto A, mostrou perda de microvilosidades nas células do epitélio (comparar Figuras 4A e B), citoplasma menos eletrondenso, com menor número de organelas e alta incidência de figuras mielínicas próximas a lâmina basal (Figura 4C). Entre as células da região lateral tornou-se comum a presença de células regenerativas (Figura 4B). Foi observado que parte do epitélio da região lateral dos animais dos pontos impactados pode manter-se intacto como mostra a parte inferior da Figura 4B.

Os depósitos protéicos detectados pelo azul de bromofenol nas células da região abfrontal (Figuras 3A, B), sob o microscópio eletrônico de transmissão, mostraram ser vacúolos digestivos no interior de hemócitos que invadiram o tecido e colocaram-se abaixo das células abfrontais (Figura 4D).

Nos animais dos pontos mais impactados, a lâmina basal, na região dos discos ciliares, mostrou-se mais espessada, com duas camadas distintas, uma mais eletrondensa e outra pouco eletrondensa com os componentes mais dispersos (comparar Figuras 4A e E).

A ultra-estrutura das células frontais dos animais do ponto A (Figura 5A) mostraram-se bem preservadas em comparação com as dos animais dos pontos B e C

(Figura 5B). Nestes pontos, as células frontais mostraram citoplasma pouco eletrondenso com perda de organelas e cílios. O número das microvilosidades diminuiu e sua distribuição apresentou-se de modo desordenado. Entre estas células foi detectada a presença de células secretoras com grânulos de diferentes eletrondensidades que podem corresponder às células coradas com as técnicas histoquímicas (Figura 5B). Entre as células frontais, na região basal das mesmas, foram detectadas células regenerativas.

Na região frontal do filamento, em comparação com o ponto A (Figura 5C), as células laterais dos pontos B e C mostraram citoplasma menos eletrondenso, principalmente na região basal da célula, e aumento no número de mitocôndrias; estas, por sua vez, apresentaram menor tamanho (Figuras 5D).

Discussão

As células das regiões lateral e abfrontal são ricas em microvilosidades e, portanto, têm papel importante na absorção de substâncias da água que circunda os filamentos branquiais (David et al., artigo 5). Neste trabalho, foi detectada a diminuição das microvilosidades nestas duas regiões do filamento, nos indivíduos dos pontos B e C; este fato pode ser considerado uma desestruturação das células após a absorção de partículas indesejadas, ou um meio de evitar a absorção de tais partículas. A redução das microvilosidades resulta em redução de absorção e, provavelmente, em diferenças fisiológicas que devem ser compensadas de alguma forma pelo organismo.

Gregory et al. (2002) ao submeterem o bivalve *Perna perna* a concentrações de mercúrio, observaram diminuição e alteração na estrutura das microvilosidades, mas não relacionaram o fato com alguma perda de função dos filamentos branquiais.

As células dessas duas regiões mostraram também citoplasma pouco eletrondenso, com poucas organelas e mudança na organização do epitélio que tornou-se mais alto, pode-se sugerir que uma possível mudança nas características da membrana destas células pode ter ocasionado uma entrada aumentada de água nestas células o que ocasionou tal fenômeno. O desprendimento do epitélio também foi observado por Sunila (1988) e Gregory et al. (2002); estes últimos chamam tal alteração de edema intercelular.

As células do epitélio, expostas diretamente aos poluentes, estão sujeitas a alterações que podem resultar na morte e renovação das mesmas. A renovação deve ser feita pelas células regenerativas que aparecem entre as células da região lateral, e as células mortas devem ser exfoliadas ou fagocitadas. A exfoliação de células branquiais foi observada por Potter et al. (1997) como renovação natural do órgão, ou como resultado de fatores como o aumento da temperatura. Já a fagocitose, deve ser realizada por hemócitos que atravessam o vaso de hemolinfa e alcançam os tecidos.

O aumento do número de hemócitos no vaso de hemolinfa e a invasão de hemócitos no epitélio lateral e abfrontal encontrados aqui nos pontos B e C, são considerados como sinais de mecanismos de defesa, como descrito por Sunila (1988), e podem ser revertidos caso a exposição cesse. Segundo Bernet et al. (1999), a invasão celular é considerada uma alteração moderada e reversível caso o agente estressor seja neutralizado.

As células frontais, dos pontos B e C, também devem sofrer renovação, uma vez que apresentaram características como citoplasma pouco eletrondenso, poucas organelas e desorganização das microvilosidades, além de ser observada a presença de células regenerativas entre as mesmas. Notamos também, um aumento no número de células

secretoras nesta região, sendo que o produto destas células pode agir como barreira para poluentes que podem facilmente penetrar nestas células tão prejudicadas.

O aumento no número de mitocôndrias nas células laterais, dos pontos B e C, pode ser relacionado com as outras alterações observadas no filamento branquial. Este aumento, resulta em acréscimo na produção de ATP e, provavelmente, maior batimento ciliar, fazendo com que mais água circule entre os filamentos. Desta forma, tal alteração pode ser considerada como um modo de compensar a dificuldade dos animais em realizar trocas gasosas, devido às alterações nas regiões lateral e abfrontal.

Sunila e Lindstrom (1985) detectaram alterações nos discos ciliares de *Mytilus edulis* expostos ao cobre e ao cádmio. Estas alterações podem ocasionar a separação dos filamentos branquiais e uma desorganização de toda a estrutura branquial. As alterações na lâmina basal dos discos ciliares detectadas neste estudo, podem funcionar como um meio de evitar a separação dos filamentos branquiais.

Conclusão

Os animais estudados aqui, desenvolveram-se nos locais de coleta e durante todo o tempo foram expostos aos poluentes presentes nos pontos de coleta; assim, as alterações encontradas nos filamentos branquiais mostram uma tentativa de impedir a entrada de poluentes, evitando que estes alcancem o vaso de hemolinfa e, conseqüentemente, todo o resto do organismo. Estas alterações resultam, também, numa maior renovação das células do epitélio branquial, que, se ocorrerem de forma desordenada, podem levar a alterações mais sérias e irreversíveis como a hiperplasia dos filamentos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, ao CNPq e à FUNDUNESP pelo suporte financeiro, à “Náutica da Ilha” e Márcia M. Hoshina pela ajuda nas coletas, à Cristiane M. Mileo, pelas ilustrações e à Gerson Mello Souza, Monika Iamonte e Antonio T. Yabuki pela ajuda na execução das técnicas.

Referências bibliográficas

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish Diseases* 22, 25-34.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). Relatório: Sistema estuarino de Santos e São Vicente. São Paulo, SP: CETESB; 2001.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S. artigo 5. Caracterização histológica, histoquímica e ultra-estrutural dos filamentos branquiais de *Mytella falcata* (Bivalvia).

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos Estuary. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22, 203-210.

Gregory, M.A., Marshall, D.J., George, R.C., Anandraj, A., McClurg, T.P., 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. *Marine Pollution Bulletin* 45, 114-125.

Junqueira, L.C.U., Junqueira, M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora Santos, São Paulo.

Kummrow, F., Rech, C.M., Coimbra, C.A., Umbuzeiro, G.A., 2006. Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutation Research* 609, 60-67.

Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemical: Theoretical and Applied*. Churchill.

Potter, T.M., MacDonald, B.A., Ward, J.E., 1997. Exfoliation of epithelial cells by scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal variation and the effects of elevated water temperatures. *Marine Biology* 127, 463-472.

Sunila, I., 1988. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *Journal of Invertebrate Pathology* 52, 137-141.

Sunila, I., Lindstrom, R., 1985. The structure of the interfilamentary junction of the mussel (*Mytilus edulis* L.) gill and its uncoupling by copper and cadmium exposures. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81C, 267-272.

Tabela 1. Concentração de alguns poluentes encontrados nos sedimentos dos três pontos estudados no estuário de Santos (CETESB, 2001).

Substâncias analisadas	A	B	C
As	0,65	4,50	3,83
Cd	0,98	<0,05	1,38
Pb	26,33	15,00	219,66
Cu	20,33	12,00	39,33
Metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
Cr	34,33	36,33	56,00
Mn	232,66	208,66	967,66
Hg	0,40	0,70	0,66
Ni	19,66	12,33	25,00
Zn	60,00	55,66	698,33
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)			
	37,46	620,73	320553,3
Solventes aromáticos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	11,41	<1,00	39,39
Bifenilas policloradas (PCB) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	4,43	1,08	30,24
Pesticidas organoclorados ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	9,00	<1,00	<1,00
Compostos fenólicos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	62,86	121,26	1952,32

LEGENDAS



Figura 1. Mapa da região de estudo com os pontos amostrais e fontes poluidoras. ○ = pontos de coleta; ● = indústrias; --- = rodovias;  = terminais de granéis líquidos;  = terminais de fertilizantes e lavagem de isocontainers.

Figura 2. Cortes histológicos dos filamentos branquiais de *Mytella falcata*. **A.** animais do ponto de referência (ponto A); **B-F.** alterações encontradas nos animais dos pontos B e C; **B.** desprendimento do epitélio; **C.** células cúbicas no epitélio da região lateral; **D.** vaso de hemolinfa repleto de hemócitos; **E.** invasão de hemócitos no epitélio (seta); **F.** hiperplasia dos filamentos (seta). Barras em A-E = 10µm e em F = 50µm

Figura 3. Cortes histológicos dos filamentos branquiais de *Mytella falcata* submetidos às técnicas histoquímicas de azul de bromofenol (**A-C**) e PAS (**D**). **A, B.** detalhes da região abfrontal dilatada, e com a presença de estruturas protéicas; **C.** detalhe da região frontal evidenciando uma célula secretora (seta) marcada com azul de bromofenol; **D.** detalhe da célula secretora (seta) da região frontal corada também pela técnica para detecção de polissacarídeos. Barras = 50µm

Figura 4. Micrografia eletrônica dos filamentos branquiais de *Mytella falcata*. **A.** epitélio da região lateral dos animais do ponto A; **B.** região lateral do filamento dos animais dos pontos B e C, notar as alterações em uma das faces enquanto na outra o epitélio parece intacto (parte inferior da foto); **C.** detalhe de figura mielínica (fm) visualizada próxima a lâmina basal; **D.** região abfrontal com granulócitos logo abaixo das células abfrontais (ca) que formam a região; notar a presença de vacúolos digestivos

(vd) nos granulócitos; **E.** detalhe da lâmina basal na região dos discos ciliares, mostrando duas camadas distintas. cr = célula regenerativa; g = granulócito; lb = lâmina basal; m = mitocôndria; mv = microvilosidades; n = núcleo; v = vaso de hemolinfa. Barras em A, C e E = 1 μ m e em B e D = 2 μ m

Figura 5. Micrografia eletrônica dos filamentos branquiais de *Mytella falcata*. **A.** células frontais do ponto A; **B.** células frontais dos pontos B e C, notar a presença de célula secretora (cs); **C.** células laterais do ponto A; **D.** células laterais dos pontos B e C, notar mitocôndrias de menor tamanho e em maior número. c = cílios; cb = corpúsculo basal; lb = lâmina basal; m = mitocôndria; mv = microvilosidades; n = núcleo; rer = retículo endoplasmático rugoso. Barras = 5 μ m

Figura 1

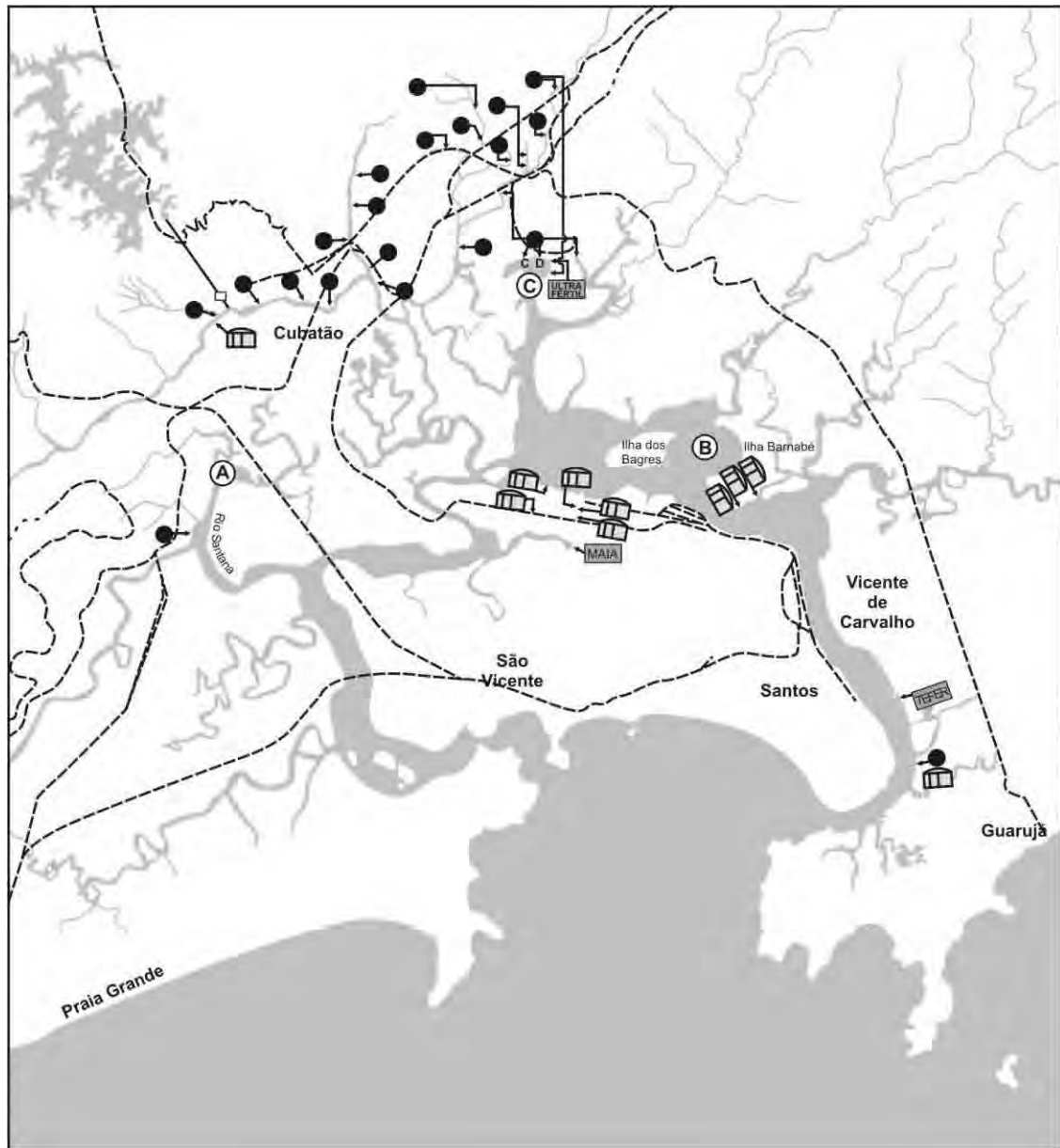


Figura 2

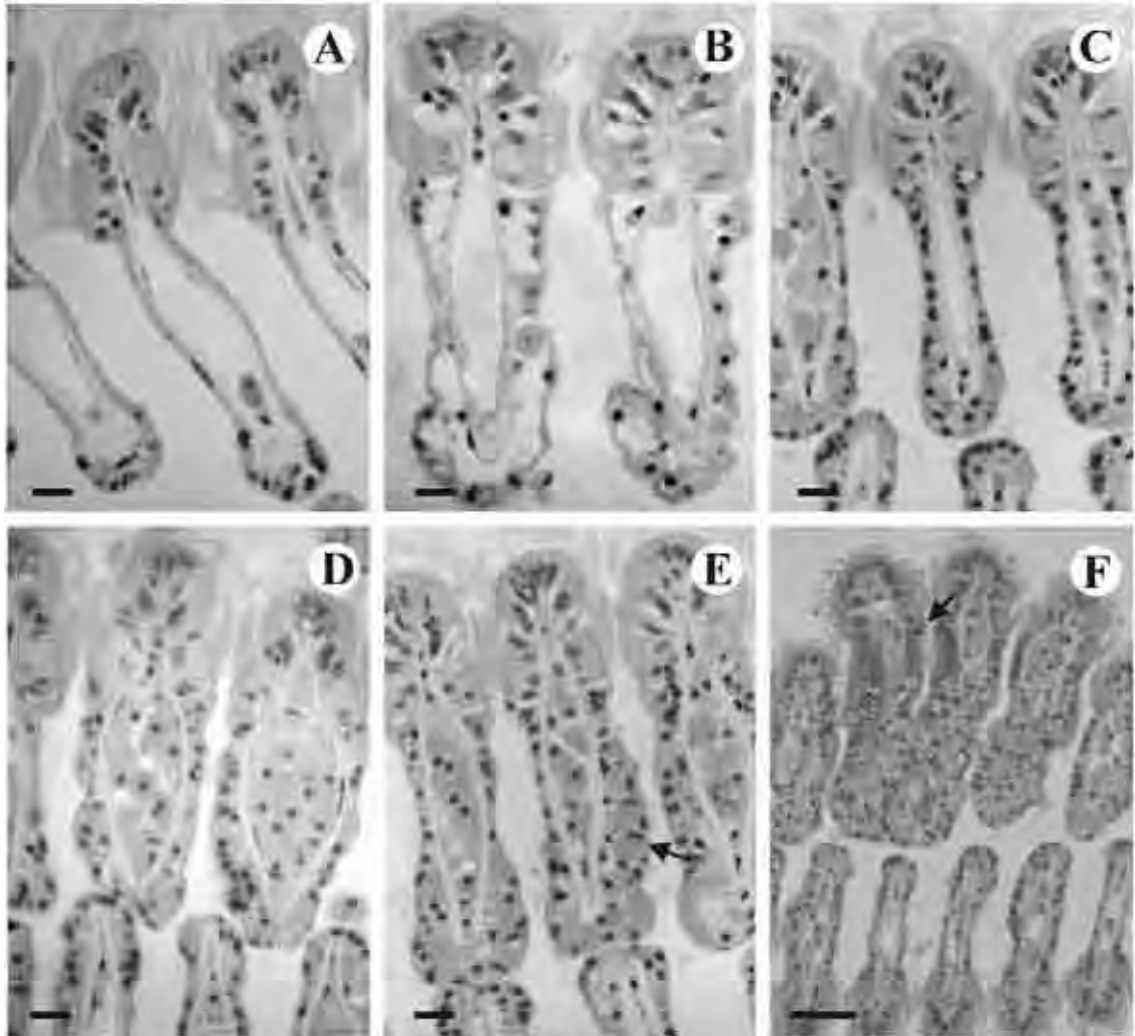


Figura 3

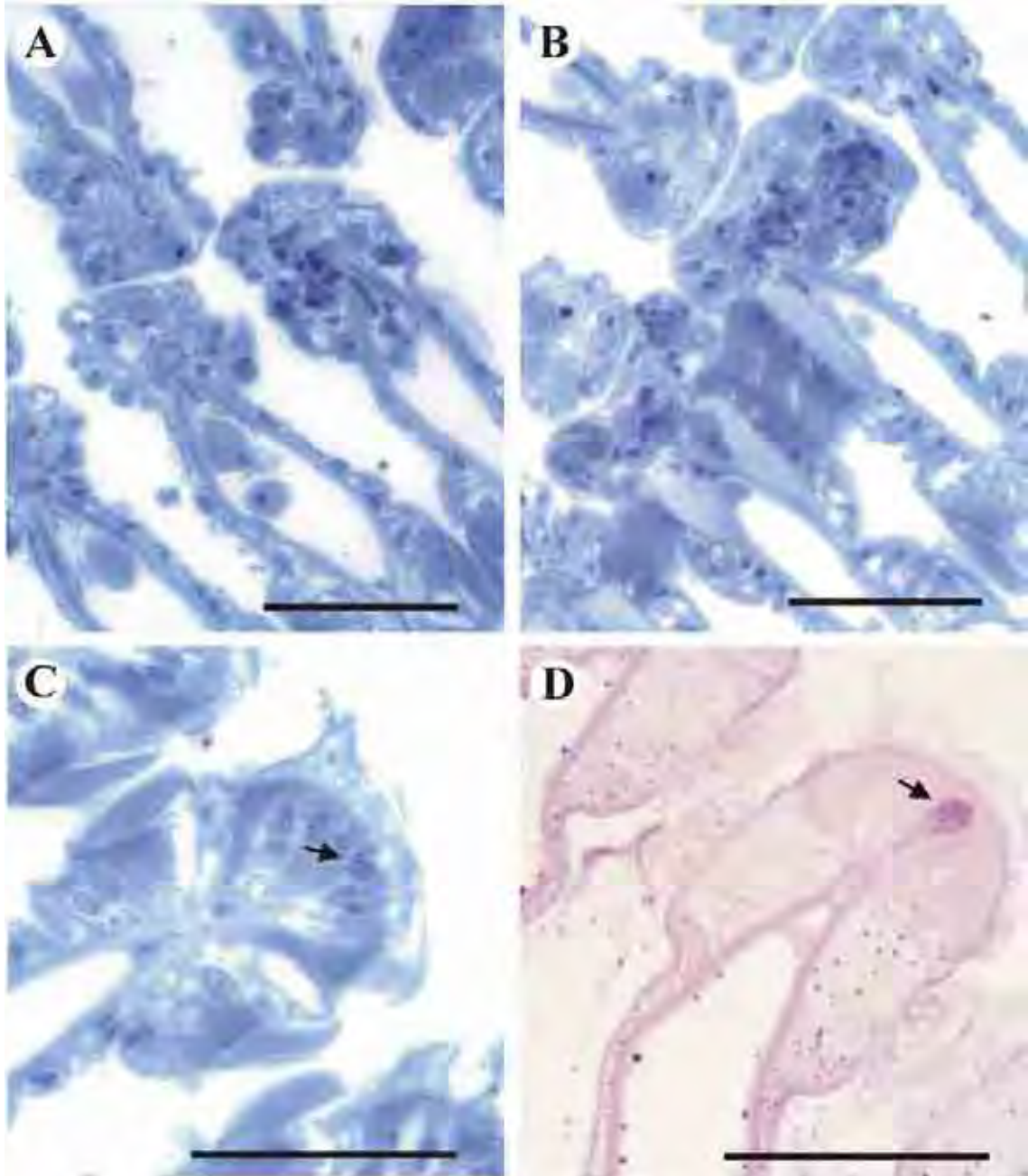


Figura 4

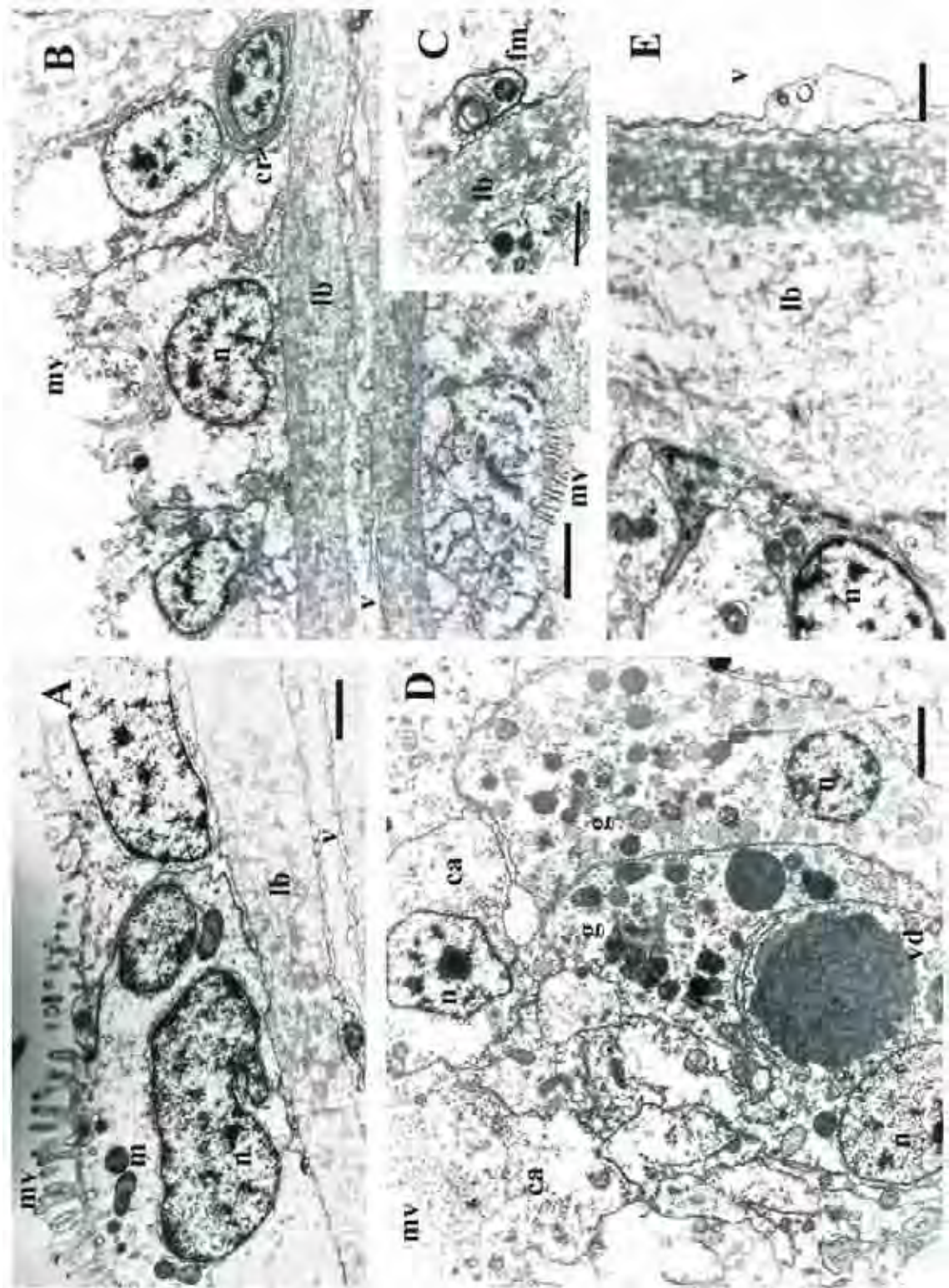
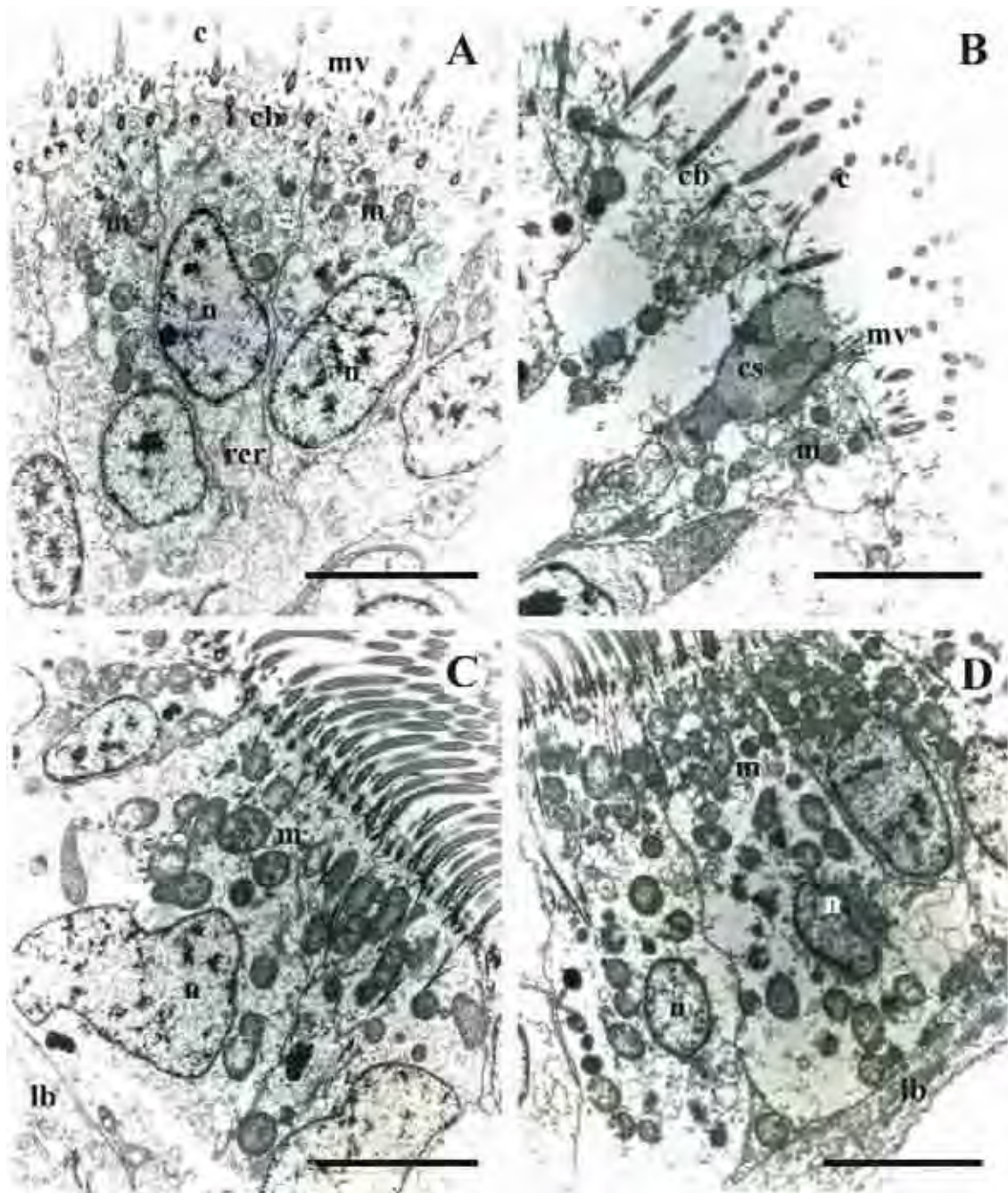


Figura 5



7.7. O papel do muco nas brânquias de *Mytella falcata* cronicamente expostas a ambientes poluídos.

Este artigo será enviado para o periódico “Ecotoxicology and Environmental Safety” e, por isso, segue as normas de formatação sugeridas pelo mesmo.

O papel do muco nas brânquias de *Mytella falcata* cronicamente expostas a ambientes poluídos.

José Augusto de Oliveira David*, Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor para correspondências: Tel.: +55 19 35264135; fax: +55 19 35264136.

E-mail: zedavid@bol.com.br

Resumo

Os moluscos bivalves são capazes de concentrar poluentes, porém em quantidades elevadas, estes poluentes podem induzir mudanças comportamentais, fisiológicas e nas respostas celulares. O muco é indispensável para muitos processos metabólicos e comportamentais em moluscos marinhos e possui papel importante na forma como estes animais lidam com poluentes ambientais. Desta forma, este trabalho analisou o número de células mucosas presentes nos filamentos branquiais de *Mytella falcata*, provenientes de três pontos do estuário de Santos: um ponto de referência (ponto A) e dois pontos que apresentam altos níveis de poluição (pontos B e C). As brânquias dos animais coletados foram submetidas à rotina histológica e à reação histoquímica de PAS para detecção de polissacarídeos. O número de células mucosas foi analisado estatisticamente. As células mucosas foram encontradas na região frontal, lateral e abfrontal do filamento branquial. Foi detectado aumento no número de células mucosas em todas as regiões do filamento nos pontos B e C, quando comparados ao ponto de referência (ponto A); este aumento se deu preferencialmente na região frontal do filamento. Sugere-se que o muco produzido pelas células das regiões lateral e abfrontal tem a função de eliminar os poluentes previamente absorvidos, além de evitar a entrada de poluentes nestas regiões através de difusão passiva. Já o muco produzido pelas células da região frontal teria como função principal capturar poluentes e eliminá-los como pseudofeces ou concentrá-los, para posterior eliminação juntamente com o muco.

Palavras-chave: histoquímica, moluscos, estuário de Santos, biomonitoramento, células mucosas

1. Introdução

Nas últimas décadas, a ocorrência de acidentes com produtos químicos levou o homem a aumentar gradativamente seu interesse pelas questões ambientais. Vários países deram início a pesquisas para avaliação do nível de contaminação por metais e compostos orgânicos em efluentes de vários ramos industriais (Zagatto, 2006).

O estuário de Santos é de grande importância econômica para o Brasil, uma vez que abriga o maior porto da América Latina e o maior complexo industrial do país, incluindo siderúrgicas, indústrias químicas e de fertilizantes. Esta região já foi considerada um exemplo de degradação costeira e apesar de ter demonstrado grande melhora na qualidade das águas, seu sedimento continua contaminado (Kummrow et al., 2006).

Os moluscos bivalves são capazes de concentrar metais presentes em soluções, alimento e material particulado no ambiente marinho. Quantidades elevadas destes metais podem levar a mudanças comportamentais, fisiológicas e nas respostas celulares (Sze e Lee, 1995).

O muco é indispensável para muitos processos metabólicos e comportamentais, importantes em moluscos marinhos. O muco é produzido e usado na ingestão, incluindo a captura e o transporte de partículas nas brânquias; está envolvido também na produção de pseudofeces e ajuda na prevenção da perda de água quando os animais estão expostos ao ar (Sze e Lee, 1995).

Tan e Lim (1984) relataram que o primeiro sintoma visível de toxicidade do chumbo no bivalve *Perna viridis* é o aumento da produção de muco que resulta em formação de espuma na água.

O mexilhão *Mytella falcata* é encontrado no litoral Atlântico da Venezuela até a Argentina e também na costa do Pacífico e Ilhas Galápagos. Esta espécie é encontrada semi-enterrada em regiões estuarinas, fornecendo dados sobre as condições do substrato (Narchi e Galvão-Bueno, 1983). No estuário de Santos, Brasil, a espécie é amplamente explorada pelos moradores locais como fonte de alimento, uma vez que é abundante na região.

Este trabalho buscou analisar o número de células mucosas presentes nos filamentos branquiais de *Mytella falcata*, provenientes de três localidades do estuário de Santos, os quais apresentam diferentes graus de ação antrópica.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Indivíduos da espécie *Mytella falcata* com aproximadamente 4,0 cm de comprimento foram coletados juntamente com a água dos respectivos pontos de coleta e levados até o laboratório, onde foram acomodados em aquários com 5 litros de água dos pontos de coleta com aeração constante por 24 horas. Este procedimento foi adotado a fim de minimizar os danos causados pelo estresse da coleta e do transporte dos animais. As análises histológicas e histoquímicas foram realizadas em 19 indivíduos do ponto A, 20 do ponto B e 13 do ponto C coletados de maio de 2004 a fevereiro de 2006.

2.2. Pontos de coleta

Os pontos de coleta aqui analisados foram escolhidos devido a abundância de exemplares de *Mytella falcata* nos mesmos; além disso, estes pontos foram previamente estudados (CETESB, 2001), o que nos forneceu dados das características ambientais e

dos poluentes neles presentes. Os três pontos são canais estuarinos que sofrem a influência das marés e possuem águas salobras. Em dois dos pontos estudados (A e B), os bivalves coletados encontravam-se formando bancos no estuário, com os animais interconectados pelo bisso e semi-enterrados no sedimento. Já no ponto C, os bivalves, apesar de estarem conectados pelo bisso, estavam presos a pilares de concreto, a aproximadamente 3 metros de distância do sedimento. Em todos os pontos de coleta, os bivalves se encontravam na região entremarés, sendo expostos ao ar nos períodos de maré baixa. Quando submersos (em maré alta), em todos os pontos de coleta, os bivalves ficavam, praticamente, à mesma distância da superfície da água

O ponto A (23°55.052'S, 46°26.975'W) está localizado em uma região menos impactada por despejos industriais. O ponto B (23°54.659'S, 46°20.464W) (Largo do Canéu) sofre influência do porto de Santos e, segundo Kummrow et al. (2006), o despejo de esgoto doméstico é a única fonte identificada de poluição. O ponto C (23°52.597'S, 46°22.583'W) localiza-se em frente a uma grande siderúrgica, é a área mais contaminada e recebe despejos da siderúrgica e de esgoto e, segundo Kummrow et al. (2006) as concentrações de HPA podem alcançar 347.55 µg/g de sedimento (peso seco). Na Tabela 1 estão resumidos os dados obtidos para os sedimentos da região em coletas de 1998 e 1999 realizadas pela CETESB retirados do relatório de 2001 sobre o sistema estuarino de Santos e São Vicente (CETESB, 2001). A análise da água nessas regiões não demonstrou concentrações de poluentes superiores às estabelecidas pela legislação pertinente (CETESB, 2001).

2.3. Análise das células mucosas

Os indivíduos foram dissecados e as brânquias fixadas em solução de Bouin aquoso. O material foi submetido a um banho em solução tampão fosfato por 24 horas, desidratado em etanol e incluído em historesina JB4. Os blocos obtidos foram seccionados com 5 µm de espessura, em micrótomo Sorvall JB4 (Bio Rad) com navalha de vidro, e submetidos à reação histoquímica para detecção de polissacarídeos. A técnica utilizada foi a do PAS, segundo Junqueira e Junqueira (1983), descrita a seguir.

As lâminas foram colocadas em solução de ácido periódico 1% durante 30 minutos; em seguida, foram lavadas em água destilada, colocadas no reativo de Schiff por 1 hora, lavadas em água sulfurosa por 9 minutos e em água corrente por 30 minutos, secas e montadas com Bálsamo do Canadá.

2.4. Análise estatística

O número de células mucosas foi contado em 50 filamentos branquiais de cada indivíduo analisado. Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) com o teste de Dunnett, para comparação entre os pontos de coleta.

3. Resultados

Neste trabalho foi identificada a presença de células mucosas em três posições diferentes nas brânquias de *Mytella falcata*: nas regiões frontal, lateral e abfrontal do filamento (Figura 2).

O maior número de células mucosas foi observado na região lateral dos filamentos branquiais de *Mytella falcata* (Tabela 2). A região frontal apresentou os

menores números de células mucosas e na região abfrontal foram encontrados valores intermediários. Esta distribuição foi observada em todos os pontos analisados.

O ponto A (ponto de referência) apresentou menor número de células mucosas quando comparado aos outros pontos de coleta. Em relação ao ponto B, esta diferença mostrou-se altamente significativa ($p < 0,01$) nas regiões frontal e lateral e também em relação ao número total de células. Quanto à região abfrontal dos animais do ponto B, o aumento em relação ao ponto de referência (ponto A) foi significativo ($p < 0,05$) (Tabela 2).

O número de células mucosas nos indivíduos do ponto C, em todas as regiões do filamento, e também quanto ao número total de células observadas, foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao ponto A (Tabela 2).

Entre os indivíduos dos pontos B e C não houve diferença estatisticamente significativa no número de células, em nenhuma das regiões do filamento branquial, e nem quanto ao número total de células; o número de células é maior nos animais do ponto B, com exceção da região abfrontal, na qual o número foi praticamente igual.

Analisando a porcentagem de aumento de células mucosas nos indivíduos dos pontos B e C em relação aos do ponto A, podemos observar que a região frontal foi a que obteve maior aumento, chegando a 164% no ponto B e 121% no ponto C (Tabela 2).

4. Discussão

Segundo Beninger et al. (1993) e Beninger e St-Jean (1997), o muco produzido pelas brânquias de bivalves filtradores tem um papel importante no transporte de partículas, sendo que este muco tem características específicas para ingestão e para

rejeição. Estes autores utilizaram a técnica de PAS na detecção de células mucosas nas brânquias de diversos bivalves, a fim de identificar sua distribuição entre os grupos estudados.

No presente estudo houve prevalência de células mucosas nas regiões lateral e abfrontal do filamento. O muco produzido por estas células segue para a região abfrontal, a favor da corrente de água durante o processo de filtração. Segundo Dufour e Beninger (2001), este muco pode funcionar como lubrificante, reduzindo a fricção entre a água e o epitélio branquial, da mesma forma que o observado para o muco secretado na pele dos peixes. Os autores afirmam também, que são poucas as células mucosas localizadas na proximidade dos tratos ciliares da região frontal; este fato concorda com os dados aqui observados.

Bernet et al. (1999) discutiram que o muco, em peixes, tem papel importante contra organismos patogênicos, além de atuar na resistência a doenças e substâncias tóxicas, assim como uma variedade de outras funções.

Neste sentido, foi observado aqui, aumento no número de células mucosas em todas as regiões dos filamentos branquiais dos animais residentes nos pontos mais poluídos; este fato entra em conformidade com a sugestão de Tan e Lim (1984) que relacionam o aumento na produção de muco em animais expostos a poluentes, ao aumento no número de glândulas de muco, aqui tidas como as células mucosas.

Da mesma forma, Sze e Lee (1995) detectaram aumento na produção de muco em bivalves expostos ao cobre e observaram que a concentração deste metal era até seis vezes mais alta no muco do que nos tecidos dos animais; os autores concluíram que esta é uma forma de equilibrar a quantidade de metais no organismo, uma vez que o metal é secretado juntamente com o muco que é eliminado para o ambiente.

Kádár et al. (2001) sugeriram também, que o muco tem papel na exclusão de alumínio já que elevadas concentrações deste elemento foram encontradas nas pseudofezes de animais durante e após experimentos de exposição do bivalve de água doce *Anodonta cygnea*.

O aumento de células mucosas, e conseqüentemente de muco, encontrado nos animais dos pontos B e C em relação ao ponto A ocorreu preferencialmente na região frontal do filamento. Desta forma, podemos relacionar este aumento na produção de muco na região frontal com o trabalho de David e Fontanetti (2005), que detectaram, por meio de análise ultramorfológica, acúmulo de muco na região frontal do filamento branquial de *Mytella falcata*, também em indivíduos do ponto B, em estudo realizado na mesma área aqui analisada. Estes dados também podem ser relacionados com o estudo de Nicholson (2003) que expôs exemplares de *Perna viridis* ao cobre; o autor afirmou que a diminuição da taxa de filtração encontrada se deu por bloqueio ocasionado pelo aumento da produção de muco ou por danos mecânicos nos cílios, mas não por danos aos nervos.

O muco produzido pelas células frontais está envolvido na captura de alimento e deve ser ingerido, entrando na constituição das pseudofezes. Desta forma, assim como detectado por Kádár et al. (2001), se existirem poluentes ligados ao muco estes serão detectados também nas pseudofezes. O muco ingerido contendo poluentes segue o caminho do alimento e pode ser absorvido durante o processo de digestão. Desta forma, esta pode ser considerada uma via de contaminação, como observado por Soto et al. (1996) que detectaram depósitos de metais em diversos tecidos de mexilhões expostos a metais; estes depósitos, nas brânquias, encontravam-se em maior densidade nas regiões onde estão as células mucosas.

Segundo Sze e Lee (1995) existem duas hipóteses para o aumento na produção de muco: o muco é produzido a fim de seqüestrar metais e então ser excretado; ou os metais absorvidos por todo o corpo são concentrados no muco e então lançados no ambiente.

Portanto, podemos sugerir que o muco produzido pelas células das regiões lateral e abfrontal tem a função de eliminar os poluentes previamente absorvidos, além de evitar que substâncias presentes na água penetrem nos tecidos das regiões lateral e abfrontal através de difusão passiva. Já o muco produzido pelas células da região frontal teria como função principal capturar eventuais poluentes formando compostos que poderiam ser eliminados como pseudofeces ou concentrados, para posterior eliminação juntamente com o muco.

Os pontos aqui analisados apresentam como poluentes principais, compostos orgânicos como os HPAs, mas a maioria dos trabalhos relacionando produção de muco à presença de poluentes foi realizada com metais. Contudo, os animais aqui analisados parecem apresentar o mesmo comportamento dos animais expostos a metais; desta forma, podemos sugerir que a secreção de muco funciona de forma semelhante para os dois tipos de poluentes.

Os sedimentos da região estudada são considerados um grande depósito de poluentes (CETESB, 2001; Kummrow et al., 2006); desta forma, a proximidade dos animais em relação ao sedimento, ou a forma como este é manipulado (como por exemplo, as dragagens constantes no ponto B que ressuspendem o sedimento), podem influenciar na produção de muco, como detectado por David e Fontanetti (2005) e por este estudo, nos quais o ponto com sedimento mais contaminado (ponto C) não foi o que apresentou as maiores alterações, uma vez que as dragagens neste ponto estão

proibidas (Kummrow et al., 2006) e os animais ali coletados estão distantes do sedimento.

5. Conclusão

Foi concluído que indivíduos da espécie *Mytella falcata*, residentes em locais poluídos, apresentam aumento significativo no número de células que produzem muco nos filamentos branquiais; este aumento depende da posição dos animais em relação ao sedimento e se dá preferencialmente na região frontal do filamento. Sugere-se que o muco produzido nas regiões abfrontal e lateral do filamento tem a função de proteger o tecido contra a entrada de poluentes, além de eliminar poluentes previamente absorvidos; já o muco produzido na região frontal tem a função de capturar poluentes para serem eliminados posteriormente.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, à FUNDUNESP e ao CNPq pelo suporte financeiro, à “Náutica da Ilha” em Cubatão e à Márcia M. Hoshina pela ajuda nas coletas, à Cristiane M. Miléo pelas ilustrações e à Gerson Mello Souza pela ajuda na realização das técnicas histológicas.

Referências

Beninger, P.G., St-Jean, S.D., 1997. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. *Marine Biology*. 129, 389-397.

Beninger, P.G., St-Jean, S.D., Poussart, Y., Ward, J.E., 1993. Gill function and mucocyte distribution in *Placopecten magellanicus* and *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia): the role of mucus in particle transport. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98, 275-282.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22, 25-34.

CETESB, 2001. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. CETESB, São Paulo.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos Estuary. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 203-210.

Dufour, S.C., Beninger, P.G., 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of vivarve gills. *Marine Biology*. 138, 295-309.

Junqueira, L.C.U., Junqueira, M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia, Livraria Editora Santos, São Paulo.

Kádár, E., Salánki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology*. 55, 137-148.

Kummrow, F., Rech, C.M., Coimbrão, C.A., Umbuzeiro, G.A., 2006. Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutation research* 609, 60-67.

Narchi, W., Galvão-Bueno, M.S., 1983. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). *Bolm. Zool. Univ. S. Paulo*. 6, 113-145.

Nicholson, S., 2003. Cardiac and branchial physiology associated with copper accumulation and detoxication in the mytilid mussel *Perna viridis* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 295, 157-171.

Soto, M., Cajaraville, M.P.; Marigómez, I., 1996. Tissue and cell distribution of copper, zinc, and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography. *Tissue and Cell*. 28, 557-568.

Sze, P.W.C., Lee, S.Y., 1995. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Marine Pollution Bulletin*. 31, 390-393.

Tan, W.H., Lim, L.H., 1984. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis*. Aquaculture. 42, 317-332.

Zagatto, P.A. Ecotoxicologia. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti, E. Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

Tabela 1. Concentração de alguns poluentes encontrados nos sedimentos dos três pontos estudados no estuário de Santos (CETESB, 2001).

Substâncias analisadas	A	B	C
As	0,65	4,50	3,83
Cd	0,98	<0,05	1,38
Pb	26,33	15,00	219,66
Cu	20,33	12,00	39,33
Metais pesados ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
Cr	34,33	36,33	56,00
Mn	232,66	208,66	967,66
Hg	0,40	0,70	0,66
Ni	19,66	12,33	25,00
Zn	60,00	55,66	698,33
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)			
	37,46	620,73	320553,3
Solventes aromáticos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	11,41	<1,00	39,39
Bifenilas policloradas (PCB) ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	4,43	1,08	30,24
Pesticidas organoclorados ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	9,00	<1,00	<1,00
Compostos fenólicos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	62,86	121,26	1952,32

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de células mucosas encontradas nos 50 filamentos dos indivíduos analisados e a porcentagem de aumento de células em relação aos valores obtidos no ponto de referência (%^a).

Região do filamento	Ponto A		Ponto B			Ponto C		
	X	DP	X	DP	% ^a	X	DP	% ^a
Frontal	4,83	± 4,25	12,73 **	± 6,94	164	10,66 *	± 7,51	121
Lateral	39,66	± 12,08	61,73 **	± 19,41	56	52,33 *	± 14,46	32
Abfrontal	22,33	± 10,39	32,78 *	± 14,59	47	33,66 *	± 17,12	51
Total	66,94	± 19,62	107,21**	± 35,09	60	94,41 *	± 25,45	41

* p < 0,05; ** p < 0,01; X = média; DP = desvio padrão.

LEGENDAS



Figura 1. Mapa da região de estudo com os pontos amostrais e fontes poluidoras. ○ = pontos de coleta; ● = indústrias; --- = rodovias;  = terminais de granéis líquidos;  = terminais de fertilizantes e lavagem de isocontainers.

Figura 2. Cortes histológicos dos filamentos branquiais de *Mytella flacata* submetidos à técnica histoquímica de PAS. **A.** vista geral do filamento apontando as três regiões nas quais se encontram as células mucosas; **B.** região frontal; **C.** região abfrontal; **D.** região lateral. setas = células mucosas, barras = 20 μm

Figura 1

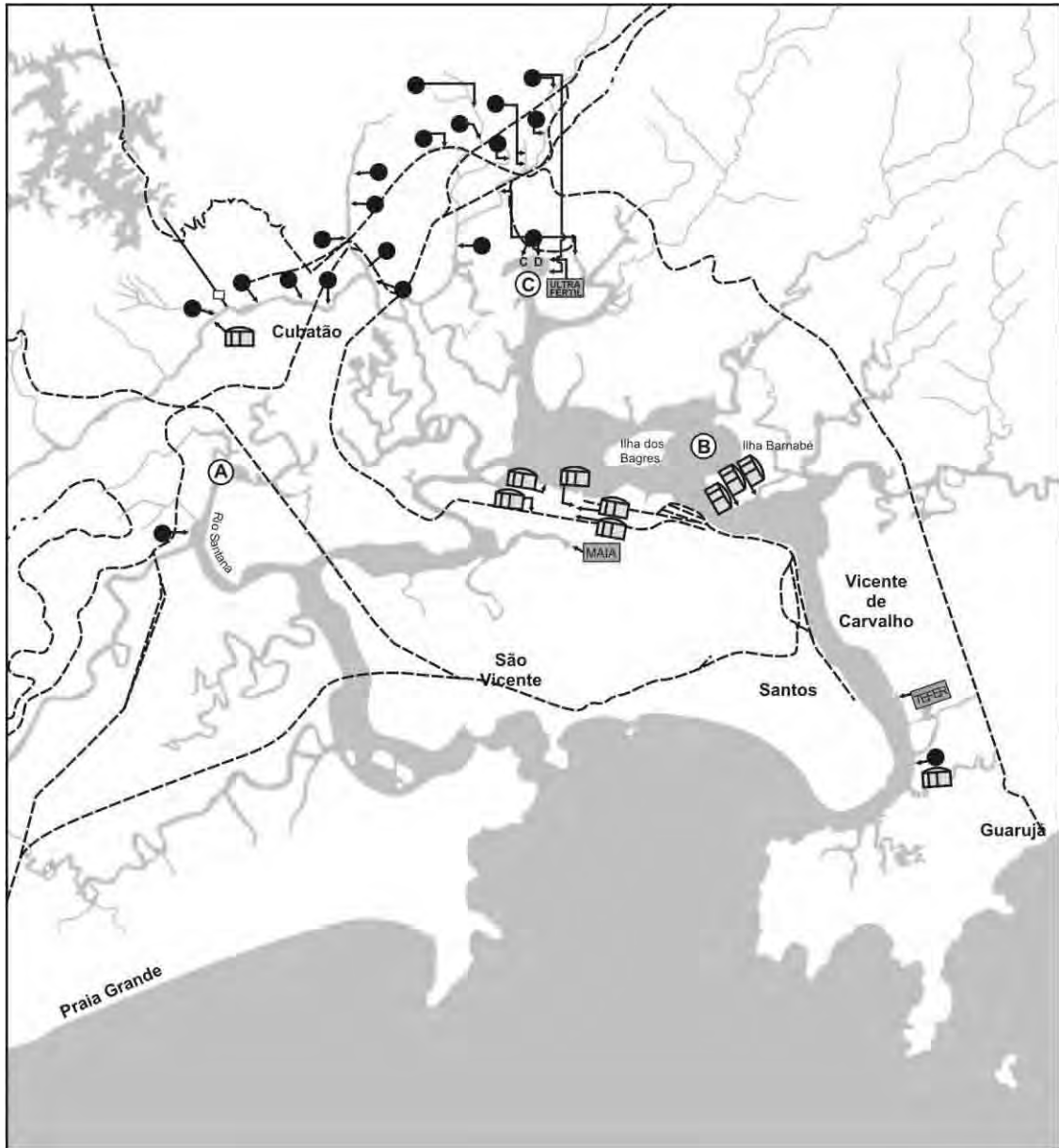
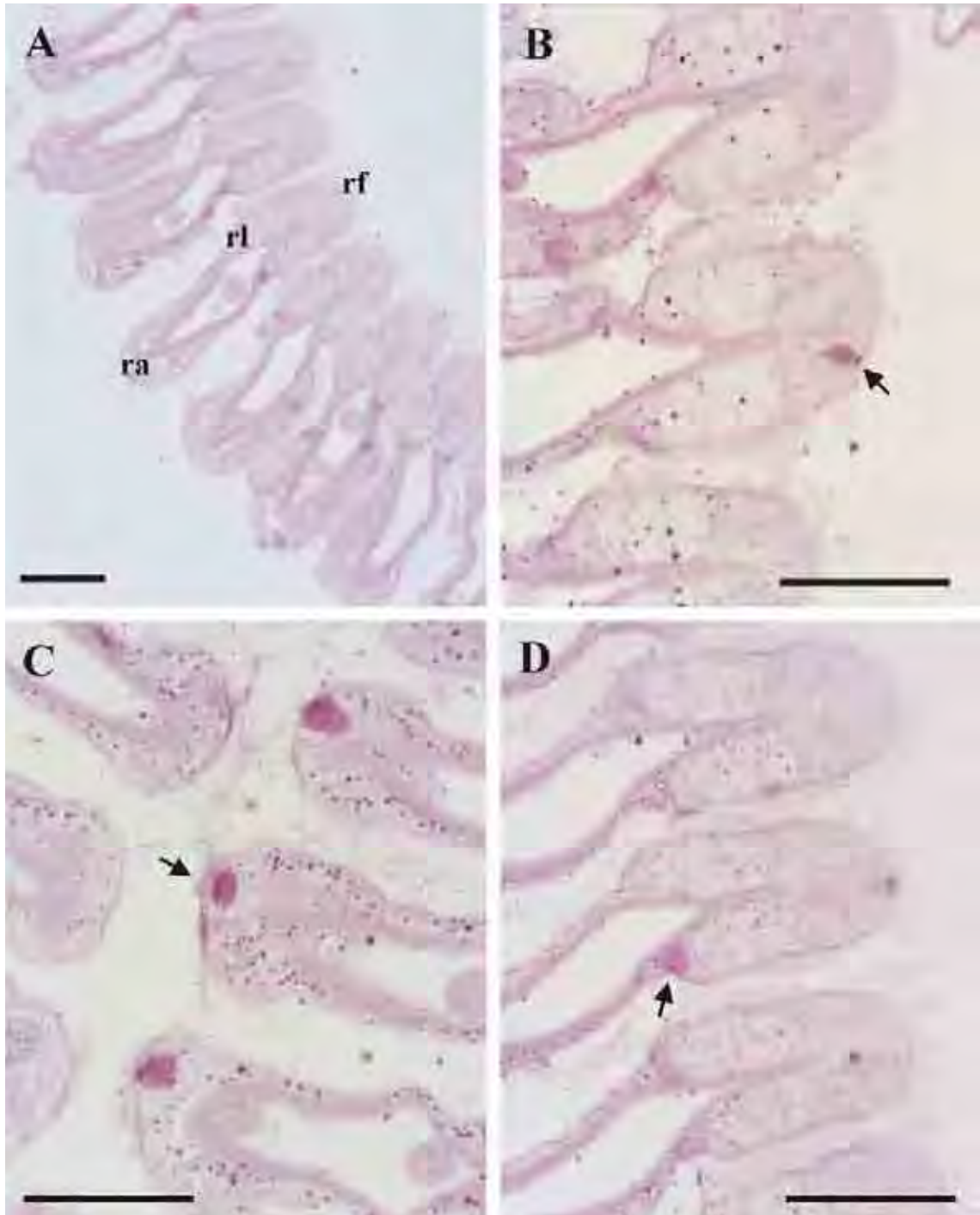


Figura 2



8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estuário de Santos é diretamente influenciado pelo Porto de Santos, o mais importante da América Latina, e pelo pólo petroquímico de Cubatã, o maior complexo industrial do Brasil. Estes fatores causaram um aumento na contaminação do ambiente aquático por vários resíduos presentes em efluentes industriais, causando efeitos diretos e indiretos na saúde humana. Esta região foi um exemplo de degradação ambiental causada por poluição industrial na década de 70, porém medidas tomadas pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) resultaram em melhoria significativa da qualidade das águas da região; por outro lado, sabe-se que os sedimentos e a biota continuam contaminados.

Os moluscos bivalves representam excelentes organismos para o monitoramento de ambientes aquáticos, uma vez que, em sua maioria, possuem hábito sésil e filtrador, sendo capazes de acumular diversas substâncias. O gênero *Mytella* é de especial interesse, uma vez que é comum em regiões tropicais e é encontrado semienterrado no sedimento de regiões estuarinas, fornecendo dados sobre as condições do mesmo.

Neste trabalho, o bivalve *Mytella falcata* proveniente de três pontos do estuário de Santos, com diferentes níveis de poluentes, foram analisados sob o ponto de vista citotóxico, genotóxico e mutagênico a fim de caracterizar os bivalves residentes no

estuário de Santos, que recebe os efluentes industriais do pólo petroquímico de Cubatão e da região portuária de Santos. Para essa caracterização foram realizadas análises histopatológicas das brânquias, incluindo técnicas histoquímicas e de microscopia eletrônica de varredura e transmissão e as técnicas do ensaio do cometa e o teste do micronúcleo.

Os resultados aqui observados culminaram nas seguintes observações e conclusões.

- 1) Foi confirmado que os sedimentos da região são grandes depósitos de substâncias tóxicas, capazes de induzir quebras no DNA e formação de micronúcleos em todos os pontos estudados
- 2) É necessária a comparação dos dados encontrados no estuário de Santos, quanto a genotoxicidade, com o de animais coletados em localidades fora do estuário de Santos a fim de obter dados de um ponto de referência.
- 3) O ensaio do cometa pode ser aplicado com maior precisão nas células da hemolinfa, em comparação com as células branquiais, de *Mytella falcata*, para detecção de danos genotóxicos. Desta forma, esta espécie e este teste podem ser utilizados para avaliar efeitos genotóxicos em regiões estuarinas e tropicais como o estuário de Santos.
- 4) Os animais residentes expostos cronicamente a poluentes podem se adaptar, e apesar de apresentarem danos genotóxicos, podem reparar estes danos de maneira eficiente, evitando o aparecimento de danos mutagênicos, evidenciados pela formação de micronúcleos.

- 5) Os filamentos branquiais da espécie estudada apresentam morfologia similar à de outras espécies da família Mytilidae, podendo ser utilizada em estudos de monitoramento ambiental.
- 6) As alterações encontradas nos filamentos branquiais mostram uma tentativa de impedir a entrada de poluentes, evitando que estes alcancem o vaso de hemolinfa e, conseqüentemente, todo o resto do organismo.
- 7) As alterações morfológicas encontradas nas brânquias indicam, também, numa maior renovação das células do epitélio branquial, que, se ocorrerem de forma desordenada, podem levar a alterações mais sérias e irreversíveis como a hiperplasia dos filamentos;
- 8) O muco produzido nas regiões abfrontal e lateral do filamento branquial tem a função de proteger o tecido contra a entrada de poluentes, além de eliminar poluentes previamente absorvidos; já o muco produzido na região frontal tem a função de capturar poluentes para serem eliminados posteriormente.
- 9) A contagem das células mucosas pode ser considerada como uma ferramenta na detecção de efeito dos poluentes na espécie *Mytella falcata*.

Neste trabalho, as diferentes análises realizadas no bivalve estuarino tropical *Mytella falcata* reafirmam que os sedimentos são grandes depósitos de poluentes e alerta as autoridades responsáveis para a periculosidade de processos de manuseio dos sedimentos, como a dragagem de regiões portuárias. Estes processos influenciam

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDTHOM, P.; WHL, T.
Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**,
Oxford, v. 22, p. 2534, 1999.

BIAS, M.; DURFORT, M.; POQET, M. Cytological effects of experimental
exposure to Hg on the gill epithelium of the European flat oyster *Ostrea edulis*:
ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. **Tissue and Cell**,
Inglaterra, v. 33, p. 178-2001.

BOFFI, A.V **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. HUCITEC: São
Paulo, 1979.

BONETTI, C. **Foraminíferos como bioindicadores do gradiente de estresse
ecológico em ambientes costeiros poluídos. Estudo aplicado ao Sistema Estuarino
de Santos – São Vicente (SP, Brasil)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo,
Instituto Oceanográfico. São Paulo. SP. 229p. 2000.

BRAUN, E.S.; BONETTI, C.M.H.; BURONE, I.; BONETTIFIHO, J.
Eutrophication and bacterial pollution cause by industrial and domestic waste at the
Baixada Santista estuarine system -Brasil. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.40, n.2, p.
165-175, 2000.

BUCHET, J. P.; PAUWELS, J.; AUBRY, R. Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. **Environ. Res.**, San Diego, v.66, p.4451, 1994.

BURELOT, T.; OLSSON, F.; GENI, F. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French Coasts. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 3946, 1996.

CARVALHO PINTOSIN, C.R.; FERREIRA, J.F.; COSTA, R.H.R.; BELFIO, P.; CREPPY E.E.; MATIAS, W. Micronucleus induction in mussels exposed to lactic acid. **Toxicol.**, Elmsford, v. 41, p. 9397, 2003.

CETESB. Síntese sobre a poluição na Baixada Santista. São Paulo. SP. 44p. 1990.

CETESB **Sistema estuarino de Santos e São Vicente.** Relatório Técnico CETESB. CETESB: São Paulo, 2001.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 20, 18 de junho de 1986: publicada no D.O.U. de 30/07/86. **In: Resoluções CONAMA 1984-1986.** Brasília, SEMA, p. 729. 1986.

DEPEDE, M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 399, p. 109-122, 1998

DIMITRIADIS, K. PAPADA K. M. Field application of autometallography and X ray microanalysis using the digestive gland of the common mussel. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 59, p. 3137, 2004.

DIXON, D.R.; WILSON, J.T. Genetics and marine pollution. **Hydrobiologia**, Holanda, v. 420, p. 2943, 2000.

DUFOUR, S.C.; BENINGER, P.G. Functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. **Mar. Biol.**, Berlin, v. 138p. 295-309, 2001.

GOUDBOUCHOT, G. SIMÁMREZ R.; ZPATAAPRÉZ O.; GÓMEZ RICADE, J. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American Oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 31, n. 412, p. 439445, 1995.

GEORGY M.A.; GORE, R.C. The structure and surface morphology of gill filaments in the brown mussel *Perna perna*. **Zool. Afr.**, Cape Town, v.35, p.121429, 2000.

GEORGY M.A.; GORE, R.C.; MARSHAL D.J.; ANANDRAJ, A.; MCCURGT.P. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 39, n. 1-12, p. 116121, 1999.

REGRY M.A.; MARSHAL D.J.; BORE, R.C.; ANANDRAJ, A.;
MCCURGT.P. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna*
and gill filament pathology after exposure to mercury. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 45,
p. 114125, 2002.

HAMOUTENE, D.;PAME, J.F.;RAHIMTUA, A.;EE, KUUse of the comet assay
to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams
exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.**,
Barking, v. 54, p. 471474, 2002.

QUIERDO, J.I.; MACHADO, GABON, F.; D'AMICO, V. BAA, IO.;
MARINO, E.; ELAS, R.; GARCIA QUEZE. Assessing pollution in coastal
ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus*
edulis. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 55, p. 2429, 2003.

JORENSEN, C.B. Bivalve filter feeding revisited. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**,
Amelinghausen, v. 142, p. 28302, 1996.

JUNQEIRA, IC.U.; JUNQEIRA, M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e
histologia**. Ivraria Editora Santos, São Paulo. 198.

WANG, E.; SANK, J.; JUDAOHSING H, R.; POOLJ.J.; MCCROHAN, C.R.; WITE, K. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v.55, p.137-148, 2001.

KIMMROW, F.; RECH, C.M.; COIMBRÃO, C.A.; UMBUZEIRO, G. Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.609, p.60-67, 2006.

ARE, A.T.; SHAW, J.P.; PETERS, ID.; MCINTOSH, A.D.; WEBSTER, L; MAJALA.; CHIPMAN, J.K. Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand break following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.**, Barking, v. 54, p. 493-497, 2002.

MARSHALL, T.; TABOT, V. Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis*: X-ray microanalysis and chemical analysis. **Chem. Biol. Interact.**, Bimerick, v. 27, p. 111-123, 1979.

MARTINS, C.C. Marcadores orgânicos geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, SP. 215p. 2005.

MASUTTI, M.B.; PANITZ C.M.N.; PEREIRA, N.C. Biodisponibilidade e bioconcentração de metais no manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC). In: **Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI**. (Espíndola et al., eds). pp.207-219. RIMA:São Carlos, 2002.

MERSCH, J.; BEAUXIS, M.N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments, **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.393, p. 141-149, 1997.

MERSCH, J.; BEAUXIS, M.N.; NAELP. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.371, p.47-55, 1996.

MITCHEMORE, C.L;CHIPMAN, J.KDN A strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147, 1998

MOORE, M.M. Cellular responses to pollutants. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 134-139, 1988.

NARCHI, W.B;BUENO, M. S. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (DOrbigny, 186) (Bivalvia: Mytilidae). **Bolm. Zool., Univ. S. Paulo**, v.6, p. 113-145, 1988.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; EITE, M.B.N.L Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. **In: Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações** (Zgatto, P.A.;Bertoletti, E ., eds), São Carlos: RiMa, 2006.

NICHOLSON, S.; AM, P. KS. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environ. Int.**, New York, v.31, p.121432, 2005.

NIBO, M.; FAENI, A.; DELBARO, I.; SCARCEL, YUCCHESI, P.; REOL AND, F.; FRENZ, G Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v.77, p. 339347, 2006.

NISHIUMA, F.N.; WER, R.R.; BÉGO, M.C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.42, n.11, p. 10641072. 2001.

PAICA, M.; BUCAR, G; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.490, p. 209214, 2001.

PAICA, M.; BUCAR, G; VETMA, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail expose do pentachlorophenol. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 465, p. 145150. 2000.

PEARSE, A.Æ. **Histolchemical: Theoretical and Applied**. Churchill, 198.

POTTER, M.T.;MACDONAD, B.A.;WIRD, J. E. Exfoliation of epithelial cells by the scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal variation and the effects of elevated water temperatures. **Mar. Biol.**, Berlin, v, 127, p. 463472, 1997.

PRÓSPERI, V.A., NASCIMENTO, I.A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. **In: Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações.** (Zgatto, P. A., Bertolatti, E., eds) São Carlos: RiMa, 2006.

RANĀJ.;JENSEN, KJESPERSEN, P.H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.58, p. 3342. 2005.

RIGNATO, J.;MANTOXNI, M.S.;JORDÃ, B.QComet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 28n. 3, p. 4644682005.

RITTSCHOF, D.;MCCEANEEN, P. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.50, p.369373, 2005.

SCARPATO, R.;MIGRE, L.;AINITOCORRETTI, G.;BARAE, R. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.21, n. 2, p. 740. 1990.

SILVA, M.;UMBUEIRO, A.;PFENNING, H.;CANHOS, P.;ESPOSITO, E. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. **Soil Sediment Contam.**, Boca Raton, v.12, n. 3, p. 345-356, 2003.

SINHA, N.P.;MCCOY, M.T.;TICE, R.R.;SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, New York, v.175, p.181-191, 1987.

SIU, W.L.;CAOB, J.;JACKSON, R.S.S.;RICHARDSON, B.J.;KID, L.;RAMA, P.S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna perna*). **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 66, p. 383-392, 2004.

SOUSA, E.C.P.M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. **In: Métodos em ecotoxicologia marinha** (Nascimento, I.A.;Sousa, E.C.P.M., Nipper, M., eds), São Paulo: Editora Artes Científicas e Indústria Ltda, 2002.

STEINERT, S.A. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. **Mar. Environ. Res.**, Barking, v. 42, p. 253-259, 1996.

SUNIA, I. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 52, p. 137-141, 198.

SUNIA, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L) from the Tväminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Ann. Zool. Fenn.**, Helsinki v. 24, p. 5569, 198.

SUNIA, I. Pollution-related histopathological changes in the mussel *Mytilus edulis* L in the Baltic Sea. **Mar. Environ. Res.**, Barking, v. 24, p. 277-288, 198.

SE, P.; LEE, S.Y. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L) and *Septifer virgatus* (Wegmann). **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.31, p.390-393, 1995.

TAN, W.; LIM, J.H. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.42, p.317-332, 198.

TICE, R.R.; AGRELE.; ANDERSON, D.; BURINSON, B.; HARTMANN, A.;
KUBAKSHI, H.; MIYAMA, Y.; ROJAS, E.; RUIZ, J.C.; SASAKI, Y. Single Cell
Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing.
Environ. Mol. Mutagen., New York, v.35, p.206-221, 2000.

TOMMASI, IR. **Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos (SP)**. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo. M. 2. 1979.

UMBUEIRO, G. A.; ROUBICEK D. A. Genotoxicidade ambiental. **In: Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações.** (Zgatto, P. A., Bertoletti, E., eds) São Carlos: RiMa, 2006.

UMBUEIRO, G. A.; KIMMROWF.; DEBORAH, A.R.; TOMINAI, M.Y. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. **Environ. Int.**, New York, v.32, p.359-364, 2006.

UMBUEIRO, G. A.; ROUBICEK D. A.; STOFFE, N.C.; RODRIGES, P.F.; RECH, C.M.; COIMBRÃO, C.A.; SATO, M.I. Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeogênicos. **O mundo da saúde**, São Paulo, v. 28n. 4, p. 436-443, 2004.

NEA, I.; VOIJEIRA, I.M.; SIK, J. ;HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 605, p. 78, 2006.

ZARONI, I.P. Teste de toxicidade com embriões de mexilhão *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) **In: Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicação no Brasil.** (NASCIMENTO, I.A. et al., ed). São Paulo: Artes Gráficas, p. 890. 2002.