



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

JULIANA CAROLINE DIAS PANTOJA

**INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA OCORRÊNCIA DE APOPTOSE E
PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE A MATURAÇÃO
GONADAL DE OSTRA DO MANGUE *Crassostrea gasar***

BELÉM – Pa

2018

JULIANA CAROLINE DIAS PANTOJA

**INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA OCORRÊNCIA DE APOPTOSE E
PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE A MATURAÇÃO
GONADAL DE OSTRAS DO MANGUE *Crassostrea gasar***



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador (a): Dr^a. **Rossineide Martins da Rocha**
Laboratório de Ultraestrutura celular ICB/UFPA

BELÉM – Pa

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

P198i Pantoja, Juliana Caroline Dias
Influência de fatores abióticos na ocorrência de apoptose e
proliferação celular durante a maturação
gonadal de Ostra do Mangue (*Crassostrea gasar*) / Juliana Caroline
Dias Pantoja. – 2018
35 f.: il. Color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia
Aquática e Pesca (PPGEAP), Instituto
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém,
2018.

Orientação: Profa. Dra. Rossineide Martins da Rocha

1. Ecologia Aquática- Estuário Amazônico. 2. Ostra de cultivo -
Reprodução. 3. Dinâmica Celular. 4. Imunohistoquímica. I. Rocha,
Rossineide Martins da, *orient.* II. Título

CDD 594.4

JULIANA CAROLINE DIAS PANTOJA

**INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA OCORRÊNCIA DE APOPTOSE E
PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE A MATURAÇÃO
GONADAL DE OSTRAS DO MANGUE *Crassostrea gasar***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Conceito: EXCELENTE

Data de aprovação: 21 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

Dr^a Rossineide Martins da Rocha (ICB/UFPA) – Orientadora/Presidente

Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira (ICB/UFPA) – Titular Membro Externo
CV: <http://lattes.cnpq.br/1832728101486131>

Prof^a Dr^a Adriana Costa Guimarães (ICB/UFPA) – Titular Membro Externo
CV: <http://lattes.cnpq.br/8549111150414569>

Prof^a Dr^a Simone do Socorro Damasceno Santos (ICB/UFPA) – Titular Membro Externo
CV: <http://lattes.cnpq.br/4573238690293498>

Prof^o Dr^o Marcelo Petracco (ICB/UFPA) - Suplente Membro Interno
CV: <http://lattes.cnpq.br/6834814201680920>

Prof^a Dr^a Diva Anelie de Araujo Guimaraes (ICB/UFPA) - Suplente Membro Externo
CV: <http://lattes.cnpq.br/2891287458034896>

BELÉM – Pa

2018

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família e aos meus amigos, pelo apoio incondicional. Meu eterno agradecimento por acreditarem e me incentivarem a realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de fazer o mestrado, pelo espaço cedido.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rossineide Martins da Rocha, pela confiança, pela exigência, por acreditar e incentivar meu crescimento científico ao longo desses 2 anos de mestrado, que somados aos 4 anos de graduação, resultam nestes 6 anos de orientação.

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira, pela oportunidade dada em 2012, pela sua orientação, seus conselhos, suas ideias. Sua visão é imprescindível aos nossos trabalhos.

À banca avaliadora por aceitar ler e contribuir com meu trabalho.

À minha família, por acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foram o que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada, ao meu irmão, mesmo me dando trabalho, sempre esteve torcendo por mim.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, que estiveram sempre comigo, me ajudando, ensinando ao longo desses anos, pelas maravilhosas pausas para o café da tarde. Em especial aos meus amigos amados “caninos”: Renata, Nando, Yanne, Breno e Juh Molica, pelo companheirismo, conselhos, risadas e muitas risadas. São maravilhosos 6 anos, e agradeço todos os dias por ter vocês em minha vida, eu os amo muito.

Aos meus amados do “mundo paralelo”, Nanny, Cléo, Brena e Rael, pelo carinho, compreensão, amor e alegria. Obrigada por serem a minha fuga da realidade. Saranghaeyo!

Aos meus amigos amados do ensino fundamental, Aline, Ronner, Marcelo e Paulo, pelo carinho, pelas conversas relaxantes e divertidas. É maravilhoso tê-los em minha vida novamente.

À minha tia coruja Rosimeire, pelas suas orações, pelo seu amor e carinho incondicional.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram sua contribuição para que eu chegasse onde estou.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
OBJETIVOS	11
Geral	11
Específicos	11
REFERÊNCIAS	12
ARTIGO. EFEITO DOS FATORES AMBIENTAIS SOBRE ATIVIDADES DE PCNA E DE CASPASE- 3 DURANTE A MATURAÇÃO TESTICULAR DE OSTRAS DO MANGUE <i>Crassostrea gasar</i>, MOLLUSCA, BIVALVE (ADANSON, 1757)	15
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Coleta dos Espécimes e Variáveis Ambientais.....	18
2.2 Microscopia de Luz e Morfometria.....	19
2.3 Imunohistoquímica	20
2.4 Índice Proliferativo (IPT) e Índice Apoptótico (IAT)	20
2.5 Análises Estatística	20
3. RESULTADOS	21
3.1 Variáveis Ambientais	21
3.2 Microscopia de Luz e Morfometria dos Túbulos	22
3.3 Morfologia Gonadal e Imunolocalização dos Marcadores de PCNA e Caspase- 3 nos Testículos	23
3.4 Índice de Proliferativo Tubular (IPT) e Apoptótico Tubular (IAT)	26
4. DISCUSSÃO	28
AGRADECIMENTOS	30
REFERÊNCIAS	31

Resumo

No estuário amazônico a espécie *Crassostrea gasar* vem sendo cultivado por pescadores locais da região. PCNA e Caspase-3 são marcadores celulares envolvidos na proliferação e morte celular, dois processos biológicos essenciais para homeostasia tecidual. Porém pouco se sabe a respeito de suas atividades sob influências de fatores abióticos em gônada masculina de ostra. Devido à importância socioeconômica e ecológica da espécie *Crassostrea gasar*, este estudo teve como objetivo avaliar se as variações dos fatores abióticos são determinantes para o equilíbrio do processo de proliferação e de morte das células germinativas de *C. gasar*. Foram obtidos um total de 227 exemplares de ostras, que foram capturadas de duas localidades. Área 1, 119 indivíduos (Vila de Nova Olinda -Pa) e área 2, 108 indivíduos (Curuçá -Pa), entre junho/2009 a maio/2010. O estudo foi dividido em quatro períodos sazonais: transicional chuvoso-seco, seco, transicional seco-chuvoso e chuvoso. Salinidade, pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido na água foram medidos in situ por uma sonda multiparâmetros durante a coleta dos espécimes. Uma média de 20 exemplares foi coletada mensalmente em cada área de cultivo. Após a coleta os exemplares foram anestesiados e eutanasiados para retirada das gônadas que foram submetidas às técnicas histológicas de rotina para caracterização e determinação dos estádios de maturação. Réplicas das lâminas previamente identificadas foram submetidas à imunolocalização para PCNA e para Caspase-3. Pela morfometria foram determinados índices tubulares de proliferação celular (IPT) e de apoptose (IAT) pela contagem das células com imunolocalização positiva por estágio de maturação das duas áreas. Dos fatores abióticos analisados, a salinidade e a precipitação foram os parâmetros que mais variaram, e diferiram significativamente entre as áreas, ao longo de todo o estudo. Constatou-se diferenças nos diâmetros dos túbulos durante o desenvolvimento gonadal. Foram encontradas variações nas atividades proliferativa e apoptótica na linhagem germinativa das ostras das duas localidades, visto que a área 1, onde a média de salinidade foi maior, apresentou índices similares de atividade de Caspase-3 e de PCNA, diferentemente da área 2, onde apresentou mais células em apoptose do que em proliferação. Essas informações podem contribuir para o manejo reprodutivo de *C. gasar* na região amazônica, pois a área 1 apresenta melhores condições para desenvolvimento e reprodução da espécie. Este estudo pode servir como modelo de estudo para futuros trabalhos cujo ambiente sofre ação de poluentes orgânicos e inorgânicos.

Palavras-chaves: Bivalve, Reprodução, Salinidade, Apoptose, Proliferação Celular

Introdução Geral

A malacocultura é uma das atividades aquícolas mais promissoras e o conhecimento dos processos reprodutivos são necessários, visto que a reprodução é um dos processos fisiológicos mais importantes no ciclo de vida de qualquer espécie de bivalve (Alvarez, 1991; Franco *et al.*, 2008; Enríquez-díaz *et al.*, 2009).

O ciclo reprodutivo é um conjunto de eventos que ocorre a partir da ativação do desenvolvimento do tecido gonadal até a produção das células sexuais maduras e posterior liberação do gameta no ambiente para que ocorra a fecundação. Este processo biológico é influenciado por fatores externos como salinidade, temperatura, oxigênio e pH, bem como fatores internos como hormônios e a dinâmica celular (Cheng *et al.*; 2002; Gosling, 2003; Franco, 2008 (Paixão *et al.*, 2013; Sampaio, *et al.*, 2017).

No estuário amazônico a pluviometria e a variação da salinidade são determinantes na reprodução de *C. gasar*, diferentemente de outras regiões de clima temperado que a temperatura é o fator limitante para a reprodução de *C. gigas*, (Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Enríque-Díaz *et al.* 2009), em *C. virginica* (Lango-Reynoso, 2006), em *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008).

A ostra do mangue, *Crassostrea gasar* (Fig. 1), é a espécie nativa que ocorre na costa amazônica (Lapègue *et al.*, 2002, Melo *et al.*, 2010) que vem sendo tradicionalmente explorada para consumo local e comercialização regional. Essa espécie habita ambientes lodosos ou rochosos formando bancos naturais no leito dos rios, permanecendo submersas ou alternadamente emersas pelas variações da maré (Varela *et al.*, 2007). Devido ao intenso consumo na região, a ostreicultura pode ser uma alternativa para atender as demandas de mercado e deve ser desenvolvida de forma responsável através do estabelecimento de cultivos controlados (Borghetti *et al.*, 2003) com metodologias adequadas às condições locais e dessa forma evitar que a exploração do recurso possa atingir seu limite biológico de renovação.

C.gasar é euralina, como as demais ostras do seu gênero. Contudo apesar da grande tolerância destes bivalves à salinidade, a duração das variações e dos altos valores da salinidade podem ocasionar alterações no crescimento, desenvolvimento fisiológico e morfológico, afetando a sobrevivência desses animais no cultivo (Cheng *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004; Christo & Absher, 2006).



Figura 1- Exemplos de *Crassostrea gasar*

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular- (PCNA) é uma proteína eucariótica nuclear altamente conservada que apresenta uma participação neste processo, sendo este observado nos núcleos das células em divisão, que se acumulam na fase G1 do ciclo celular, atingindo seu nível mais elevado durante a fase S (Ueda *et al.*, 2013). Em espécies de moluscos, o PCNA também tem sido utilizada para identificar a proliferação das células do epitélio germinativo e dos hemócitos de *C. gigas* (Hanselmann *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2010), para estabelecer a distribuição de proliferação celular na glândula digestiva do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (Motta, *et al.*, 2013), em bivalves para identificar células em proliferação nas células da linhagem espermática, pois esta proteína também está envolvida na manutenção da homeostase do tecido, auxiliando na regeneração dos túbulos seminíferos (Maga & Hubscher, 2003; Franco *et al.*, 2010).

Apoptose é o processo de morte celular programada essencial nos diversos processos biológicos tais como metamorfose, morfogênese embrionária, e remodelamento tecidual. É também um importante mecanismo de defesa do organismo vertebrados para remoção de células danificadas (Gupta, 2003; Grivicich, *et al.*, 2007; Ueda *et al.*, 2013).

Os estudos comparativos do mecanismo apoptótico entre os organismos de vertebrados e invertebrados levou ao conhecimento de que este é um processo multifuncional altamente conservado evolutivamente e desempenha um papel crucial na homeostase celular, no desenvolvimento embrionário e na defesa imunológica em organismos multicelulares (Sokolova *et al.*, 2004; Buckland-nicks & Tompkins, 2005).

As caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) pertencem à família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, exposição de fosfolipídios na membrana que irão sinalizar para estas células.

Especificamente a Caspase 3 desempenha um papel central das proteases que clivam substratos citoplásmicos e nucleares, agindo como efetoras na fragmentação celular, reforçando a seletividade e a especificidade de apoptose (Buckland & Tompkins, 2005). Conhecer os efeitos da interação entre ostras e o ambiente pode promover melhorias ao cultivo em larga escala (Funo *et al.*, 2015), especialmente em regiões onde não há produção de sementes de ostra em laboratório e o cultivo depende exclusivamente da captação artesanal em ambiente natural (Legat *et al.*, 2017).

Em função da importância socioeconômica dos moluscos bivalves, em especial ao gênero *Crassostrea*, é fundamental o desenvolvimento de técnicas que permitam melhorar a qualidade reprodutiva desses animais, sendo este, um dos processos fisiológicos mais importantes no ciclo de vida de qualquer ser vivo. Diante disso, o presente estudo propõe avaliar se as variações dos fatores abióticos são determinantes para o equilíbrio do processo de proliferação e de apoptose das células da linhagem espermática de *C. gasar* cultivada ambiente natural em duas localidades estuário amazônico, Augusto Correa e Curuçá.

Objetivos

Geral

Avaliar o efeito dos fatores ambientais sobre atividades de PCNA e de Caspase-3 durante a maturação testicular de ostra do mangue *Crassostrea gasar*, Mollusca, Bivalve (adanson, 1757)

Específicos

- Quantificar as células que sofrem apoptose e proliferação durante o desenvolvimento gonadal nas duas localidades de estudo;
- Relacionar a marcação das proteínas Caspase-3 e PCNA com os fatores abióticos nas duas áreas de estudo;
- Quantificar pela morfometria o tamanho dos túbulos espermáticos durante os estádios gonadais.

Referências

- ABEELS, H.A., LOW, A.N., VOLETY, A.K. 2012. Trophic transfer and habitat use of oyster *Crassostrea virginica* reefs in southwest Florida, identified by stable isotope analysis. *Marine Ecology. Progress Series*. **462**: 125–142.
- ALVAREZ, I.F. 1991. Reproduccion y Acondicionamiento de Bivalves em El criadero. *Conselleria de Pesca, Marrisqueo e Acuicultura*. Xunta de Galicia Coruña, Espana. **16**: 3-35.
- BUCKLAND-NICKS J., & TOMPKINS, G. 2005. Paraspermatogenesis in *Ceratostoma foliatum* (Neogastropoda): confirmation of programmed nuclear death. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. **303**: 723-741.
- CHÁVEZ-VILLALBA, J., VILLELAS-ÁVILA, F., CÁCERES-MARTÍNEZ, C. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) along coastal Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*. **38**: 268–278.
- CHENG, W., YEH, S.H., WANG, C.S., CHEN, J.C. 2002. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture*, Amsterdam. **203**: 349-357.
- CHRISTO, S. W. & ABSHER, T. M. 2008. Crescimento da prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo. **34**: 71-77.
- ENRÍQUEZ-DÍAZ M., POUVREAU S., CHÁVEZ-VILLALBA J., LEPENNEC M. 2009. Gametogenesis, reproductive investment and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture Institute*. **17**: 491-506.
- FUNES, V., ALHAMA, J., NAVAS, J. I., LO´ PEZ-BAREA, J., PEINADO, J. 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*. **119**: 214-223.
- FRANCO, A., HEUDE BERTHELIN, C., GROUX, D., SOURDAINE, P., MATHIEU, M. 2008. Fine structure of the early stages spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell*. **40**: 251-260.
- GOSLING, E., 2003. **Bivalve Mollusks: Biology, Ecology and Culture. Reproduction, Settlement and Recruitment**. Fishing News Books, Oxford-UK, pp. 131–161.
- HANSELMANN, R., SMOLOWITZ, R., GIBSON, D. 2000. Identification of proliferating cells in hard clams. *Biological Bulletin*. **199**: 199–200.
- GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B. 2007. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **53**: 335-43.
- GUPTA, S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *International journal of oncology*. **22**: 15-20.

- KISS, T. 2010. Apoptosis and its functional significance in mollusks. *Springer*. **15**: 313-321.
- LAMKANFI, M., FESTJENS, N., DECLERCQ, W., VANDEN, B. T., VANDENABEELE, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and Differentiation*. **14**: 44–55.
- LANGO-REYNOSO, F., CHÁVEZ-VILLALBA, J., LE PENNEC, M. 2006. Reproductive patterns of the pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebrate Reproduction and Development*. **49**: 41-50.
- LEGAT, J. F. A., LEGAT, A. P., FOGAÇA, F. H. S., TURECK, C. R., SUHNEL, S., MELO, C. M. R. 2017. Crescimento e sobrevivência da ostra de fundo, *Crassostrea gasar*, cultivada no nordeste e sul do Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, **43**: 172-184.
- MAGA, G. & HUBSCHER, U. 2003. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): A Dancer With Many Partners. *Journal Cell Science*. **116**: 3051–3060.
- MARIGOMEZ, I., LEKUBE, X., CANCIO, I. 1999. Immunochemical localisation of proliferating cells in mussel digestive gland tissue. *Histochemistry Journal*. **31**: 781–788.
- MOTTA, C.M., FREZZA, V., SIMONIELLO, P. 2013. Caspase 3 in Molluscan Tissues: Localization and Possible Function. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. **319**: 548-559.
- PAIXÃO, L. F., FERREIRA, M.A.P., NUNES, Z., FONSECA-SIZO, F., ROCHA, R. 2013. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. *Aquaculture*. **380-383**: 6-12.
- RODRÍGUEZ-JARAMILLO, C., HURTADO, M.A., ROMERO-VIVAS, E., RAMÍREZ, J.L., MANZANO, M., PALACIOS, E. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951.) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*. **27**: 1129 – 114.
- SAMPAIO, D.S., TAGLIARO, C.H., SCHNEIDER, H., BEASLEY, C.R. 2017. Oyster Culture on the Amazon Mangrove Coast: Asymmetries and Advances in an Emerging Sector. Reviews in *Aquaculture*. **0**: 1–17.
- SOKOLOVA, I.M., EVANS, S., HUGHES, F.M. 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology*. **207**: 3369-3380.
- TAYLOR, J. J., SOUTHGATE, P.C., ROSE, R.A. 2004. Effects of salinity on growth and survival of silver-lip pearl oyster (*Pinctada maxima*, Jameson) spat. *Journal of Shellfish Research*, Hanover. **23**: 375-377.
- UEDA, I., I. SAKAGUCHI, T., OGITA, C., YAMADA., ITANI, G. 2013. Thermal Conditions of Overwintering for Tropical Green Mussel *Perna viridis* in Uranouchi Inlet, Tosa Bay, Shikoku, Japan. *The Sessile Organisms Society of Japan*. **30**: 29–36.

HEIDEN, M.G.V., THOMPSON, C.B. 1999. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis. *Nature cell biology*. **1**: E209-E216.

HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. **407**: 770-776.

ARTIGO

EFEITO DA PRECIPITAÇÃO E SALINIDADE E PRESENÇA DE ANTI-PCNA E ANTI-CASPASE- 3 NA MATURAÇÃO TESTICULAR DE OSTRA DO MANGUE
Crassostrea gasar

O capítulo será submetido a *Journal of Molluscan Studies* (ISSN 1464-3766)

Efeito da precipitação e salinidade e presença de anti-PCNA e anti-Caspase- 3 na maturação testicular de Ostra do Mangue *Crassostrea gasar*

Juliana Caroline Dias Pantoja^{a*}, Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira^b, Luiz Fernando Silva Oliveira^b, Yanne Alves Mendes^b, Rossineide Martins da Rocha^a

^aLaboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil

^bLaboratório de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil

Laboratório de Correspondence: J.C.D., Pantoja; e-mail: pantoja.jcd@gmail.com

Resumo

PCNA e Caspase- 3 são marcadores celulares envolvidos na proliferação e morte celular, dois processos biológicos essenciais para homeostasia tecidual. Porém pouco se sabe a respeito de suas atividades sob influências de fatores abióticos em gônada masculina de ostra. Devido à importância socioeconômica e ecológica da espécie *Crassostrea gasar*, este estudo teve como objetivo avaliar se as variações dos fatores abióticos são determinantes para o equilíbrio do processo de proliferação e de morte das células germinativas de *C. gasar*. Foram obtidos um total de 227 exemplares de ostras, que foram capturadas de duas localidades. Área 1, 119 indivíduos (Vila de Nova Olinda -Pa) e Área 2, 108 indivíduos (Curuçá -Pa), entre junho/ 2009 a maio/2010. O estudo foi dividido em quatro períodos sazonais: transicional chuvoso-seco, seco, transicional seco-chuvoso e chuvoso. Salinidade, pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido na água foram medidos in situ por uma sonda multiparâmetros durante a coleta dos espécimes. Uma média de 20 exemplares foi coletada mensalmente em cada área de cultivo. Após a coleta os exemplares foram anestesiados e eutanasiados para retirada das gônadas que foram submetidas as técnicas histológicas de rotina para caracterização e determinação dos estádios de maturação. Réplicas das lâminas previamente identificadas foram submetidas a imunolocalização para PCNA e para Caspase-3. Pela morfometria foram determinados índices tubulares de proliferação celular (IPT) e de apoptose (IAT) pela contagem das células com imunolocalização positiva por estádio de maturação das duas áreas. Dos fatores abióticos analisados, a salinidade e a precipitação foram os parâmetros que mais variaram, e diferiram significativamente entre as áreas, ao longo de todo o estudo. Constatou-se diferenças nos diâmetros dos túbulos durante o desenvolvimento gonadal. Foram encontradas variações nas atividades proliferativa e apoptótica na linhagem germinativa das ostras das duas localidades, visto que área 1, onde a média de salinidade foi maior, apresentou índices similares de atividade de Caspase- 3 e de PCNA, diferentemente da área 2, onde apresentou mais células em apoptose do que em proliferação. Essas informações podem contribuir para o manejo reprodutivo de *C. gasar* na região amazônica, pois a área 1 apresenta melhores condições para desenvolvimento e reprodução da espécie. Esses achados estabelecem que nos ambientes estuarinos, salinidade e precipitação interferem na atividade das células testiculares de *C. gasar* e no sucesso reprodutivo da espécie

Palavras Chaves: Bivalve, Reprodução, PCNA, Caspase- 3

1. Introdução

Em moluscos, as mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorre durante o desenvolvimento testicular para a produção de gametas, exige um equilíbrio entre os processos de proliferação e morte de células (Kellner *et al.*, 2010). Neste contexto, destaca-se o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), uma proteína eucariótica nuclear altamente conservada utilizada como marcador em diversos estudos envolvendo a atividade mitótica, dentre eles a caracterização do epitélio germinativo (Motta, Frezza & Simoniello, 2013) e em hemócitos em *C. gigas* (Franco *et al.*, 2010).

No controle celular é ativado um mecanismo apoptótico, que pode ser desencadeada por fatores abióticos ou por estímulos internos como a sinalização hormonal. Ambas as vias levam a ativação de uma cascata proteolítica, que envolve a sinalização de proteínas iniciadoras e efetoras desse processo (Aravind, Dixit & Koonin, 2001; García-Gasca *et al.*, 2012). Dentre essas proteínas, destaca-se Caspase- 3, uma via efetora que age na fragmentação nuclear e seletividade celular (Fesus *et al.*, 1991; Clem *et al.*, 1996; Yeretssian, Labbe & Saleh, 2008).

Durante a maturação testicular, ambos os processos celulares, desempenham um papel crucial na espermatogênese (Baum *et al.*, 2005; Thripathi *et al.*, 2009) e são controlados tanto pela genética quanto pelos hormônios em resposta às condições ambientais (Schulz & Nobrega, 2011).

Zonas entre marés com exposição das ostras ao ar e insolação podem ocasionar um aumento da temperatura interna, em especial nas marés baixas, o que pode ser um fator de indução da desova nessas áreas (Gosling, 2003). No estuário amazônico, durante a estação chuvosa, as descargas de água doce dos rios influenciam diretamente nos níveis de salinidade (Paixão *et al.*, 2013), e a redução da salinidade durante a estação chuvosa pode ter um efeito estressante nas ostras, diminuindo a energia disponível para a reprodução (Souza-Filho *et al.*, 2009).

As ostras possuem extrema sensibilidade em ambientes diferentes, modificações nos períodos reprodutivos, na morfologia das valvas e sobrevivência (Brown, 1988; Pereira *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, 2017).

O gênero *Crassostrea*, compreende ostras de grande importância econômica no cenário mundial, em destaque a espécie *Crassostrea gigas* (FAO, 2017) no entanto, essa espécie tem sua sobrevivência e crescimento limitados em diversas regiões estuarinas, cujas condições superam sua capacidade de tolerância, tendo as temperaturas elevadas como fator limitante. Na região amazônica, *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) é uma espécie nativa que vem sendo cultivada em ambiente natural, que destaca-se, por apresentar desempenho satisfatório nesse

tipo de cultivo e é mais tolerante às variações de salinidade e temperatura (Christo & Absher, 2006; Baldan & Bendhack, 2009; Galvão et al., 2009; Lopes et al., 2013; Yang *et al.*, 2016). Porém, populações de uma mesma espécie cultivada em condições adversas, podem apresentar diferentes respostas aos estressores ambientais, estas podem determinar a variação na produção e crescimento dessa espécie (Brown, 1988; Lopes *et al.*, 2013; Sampaio et al., 2017).

Desse modo, tendo em vista que não há conhecimento na relação entre o ambiente e a dinâmica celular durante os estágios de maturação da gônada masculina, este trabalho tem como objetivo investigar a presença de PCNA e Caspase-3 durante a maturação testicular de *C. gasar*, de acordo com a salinidade e precipitação em dois ambientes estuarinos.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta dos Espécimes e Variáveis Ambientais

A área de estudo está localizada na porção estuarina à leste do Rio Amazonas, formada por um conjunto de inúmeras baías e estuários (Mendes, 2005). A dinâmica hidrológica é determinada pela interface rio-oceano, sazonalidade e pelas descargas máximas dos rios que ocorrem na estação chuvosa e diminuem na estação seca (Rosario *et al.*, 2009; Souza-Filho *et al.*, 2009). O clima é quente e úmido, com temperatura média em torno dos 26°C, que é regulada pelas mudanças sazonais na posição da Zona de Convergência Inter-Tropical (ZCIT), que é responsável pela formação de chuvas próximo à costa litorânea (Fisch et al., 1998). A região apresenta precipitação anual é superior a 2.000 mm, aumenta continuamente de fevereiro a outubro e decresce de novembro a janeiro (Berrêdo *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2005; Souza-Filho *et al.*, 2009).

Estas características ambientais são favoráveis a implementação de diversas técnicas de cultivo, especialmente a malacocultura (Miranda, 2002; Pinto-Coelho & Havens, 2015). Dessa forma, várias comunidades locais desenvolvem o cultivo de ostras em diversas áreas de estuário Amazônico. Mediante este cenário, foram selecionadas duas áreas de cultivo, e o critério utilizado para a seleção das áreas foi a distância entre o cultivo e o oceano. Área 1: Rio Emboraí Velho, no município de Augusto Corrêa (S 00° 52' 54" / W 046° 26' 54") (menor distância do mar - aproximadamente 5km); Área 2: Rio Tijoca, no Município de Curuçá (S 00°51' 04,0" / W 047°53'21,2") (maior distância do mar - aproximadamente 25 km) (Figura 2). Nas três áreas o cultivo é realizado em sistema de mesa-fixa – modelo muito semelhante aos sistemas de tabuleiros (Pereira *et al.*, 2001), que são construídas com madeira retirada do manguezal e mantidas dentro do rio sujeitas às variações diárias de marés. As ostras são armazenadas numa espécie de “travesseiro” (artefato de cultivo confeccionado com material à base de policloreto

de vinila (PVC)). Este estudo foi realizado no período de um ano, entre os meses de junho de 2009 a maio de 2010.

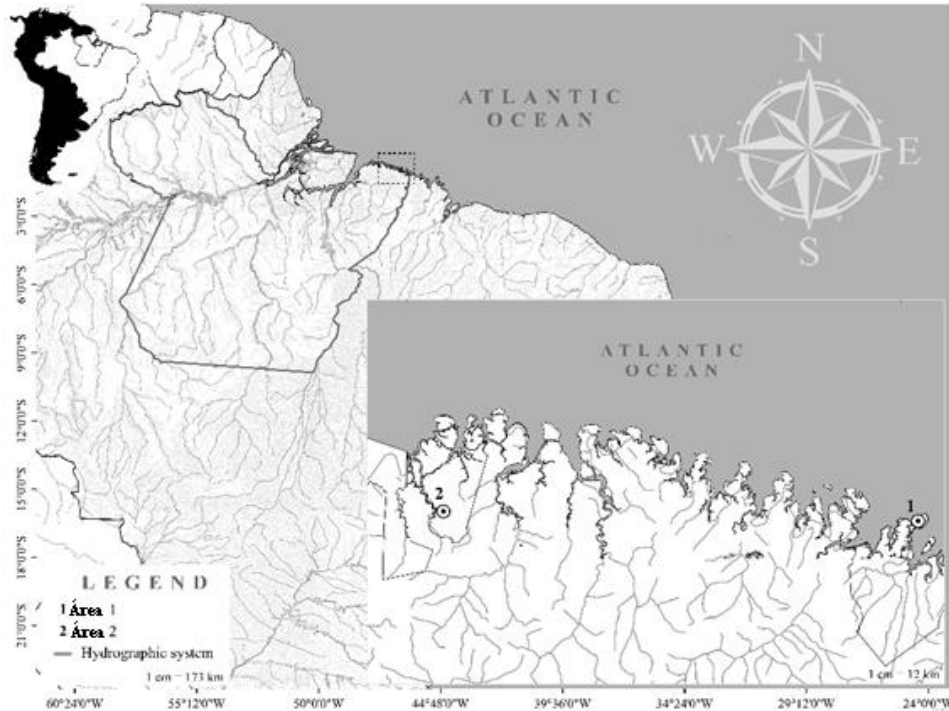


Figura 2 – Mapa de localização das áreas de estudo. 1- Estuário do Rio Emboraí Velho (município de Augusto Corrêa); 2- Estuário do Rio Tijoca (município de Curuçá).

2.2 Microscopia de Luz e Morfometria

Após a criomanesestesia, as ostras eram abertas, os fragmentos de tecido gonadal eram removidos, fixados em solução de Bouin por 24 horas e processados histologicamente para inclusão de parafina de acordo com protocolo de rotina (Prophet *et al.*, 1995). Secções de 5 μ m foram obtidos em micrótomo e corados em hematoxilina-eosina para identificar o sexo. A classificação dos estádios gonadais foi adotada de Paixão *et al.* (2013). Com auxílio de um fotomicroscópio modelo Eclipse Ci-S (NIKON, Japan) conectado a uma câmera digital DS-Ri1 (NIKON, Japan) foi realizada a análise morfométrica a partir da seleção de 10 animais de cada estágio. Em cada estágio houve análise de 10 lâminas, de cada lâmina foram analisadas seis áreas, onde foi realizado a medida de 20 túbulos seminíferos. Em cada túbulo foi mensurado tamanho das espermatogônias, espermatócitos e espermátide.

2.3 Imunohistoquímica

Réplicas de lâminas contendo cortes de testículo, cujo estágio de maturação era previamente identificado, foram desparafinizadas e hidratada. Em seguida as lâminas eram imersas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 30 minutos, lavados em PBS e incubadas em tampão citrato de sódio 0.1 M pH 6.0 por 25 minutos. Posteriormente as lâminas eram bloqueadas em soro normal de cabra (16210072, Invitrogen, Burlington, ONT, Canada) a 10% por 1 hora e incubados em anticorpo primário: policlonal anti-Caspase-3 clivada anti-coelho (AB3623, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) 1: 200 e anti-PCNA anti-coelho (ab 18197, Abcam, Cambridge, MA, USA), 1:500 *overnight* a 4° C. As diluições foram feitas em PBS contendo BSA 1% e Tween-20 0.5% por 2hs. Posteriormente as lâminas foram incubadas em anticorpo secundário anti coelho conjugado com peroxidase, 1: 500 em PBS e revelado com DAB (3,3 'diaminobenzidina) (750118, Invitrogen, Burlington, ONT, Canadá) durante 5 minutos e contra-corado com hematoxilina. Os controles negativos foram realizados pela substituição do anticorpo primário por PBS.

2.4 Índice Proliferativo (IPT) e Índice Apoptótico (IAT)

Nos cortes de testículos em diferentes estádios de maturidade, as células que demonstraram imunomarcção positiva para anti-PCNA e anti-Caspase-3 foram quantificadas. Utilizando uma ferramenta do programa *NIS-Elements Microscope Imaging Software* (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) foram selecionadas 10 lâminas de cada estágio de maturação por período sazonal de ambas as áreas, dessas lâminas foram escolhidos 10 campos visuais aleatoriamente e as células marcadas foram contadas. Posteriormente, seguindo a proposta modificada de García-Gascã *et al.* (2012) foi calculado a frequência de ocorrência de marcação positiva: para anti PCNA através do Índice de Proliferação Tubular (IPT)= Número de células positivas / número de túbulos seminíferos contados X 100; e para anti-Caspase 3 através do Índice Apoptótico Tubular (IAT) = Número de células positivas / número de túbulos seminíferos contados X 100

2.5 Análises Estatística

A variação dos dados ambientais em cada área de cultivo foi verificada pela Análise de Componentes Principais (PCA) (Legendre & Legendre, 2012). Como os dados ambientais foram mensurados em diferentes unidades de medidas, as variáveis foram padronizadas. Como critério de parada de seleção do número de eixo foi usado o Broken stick. Para avaliar se a

variação observada no gráfico era significativa foi usado análise de Permutação (Permanova) (Anderson, 2001).

Os dados morfométricos e os índices de proliferação e caspase-3 das células das linhagens espermática de *C. gasar* foram avaliados pela análise de variância ANOVA *Two-way*, seguindo os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, e as diferenças entre as áreas foram verificadas posteriormente pelo teste Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0 (IDSM, MCT, CNPq, Belém, Pará, Brasil).

3. Resultados

3.1 Variáveis Ambientais

As variáveis ambientais apresentaram diferenças significativas (Pseudo F: 9.462; $p=0.001$) entre as áreas de cultivo foram apenas precipitação e salinidades. Os eixos da PCA explicaram 74,2% dessa variação (Figura 2; Tabela 1). O eixo1 explicou 54,2% da variação, e as variáveis que mais contribuíram para sua formação foi precipitação (positivamente relacionada ao eixo) e a salinidade (negativamente relacionada ao eixo). O eixo 2 explicou 20,0% da variação restante. A área 1 apresentou maiores valores de salinidade, enquanto a área 2 teve os maiores valores de precipitação.

Tabela 1 – Contribuição das variáveis abióticas da água das áreas de cultivo aos eixos 1 e 2 da Análise de Componentes Principais

	Eixo 1	Eixo 2
Precipitação	0.839	-0.318
Salinidade	-0.923	0.066
Temperatura	-0.554	-0.607
OD	0.573	-0.579
pH	-0.580	-0.558
Broken stick	2.283	1.283
Autovalor	2.710	0.998
% de explicação	0.542	0.200

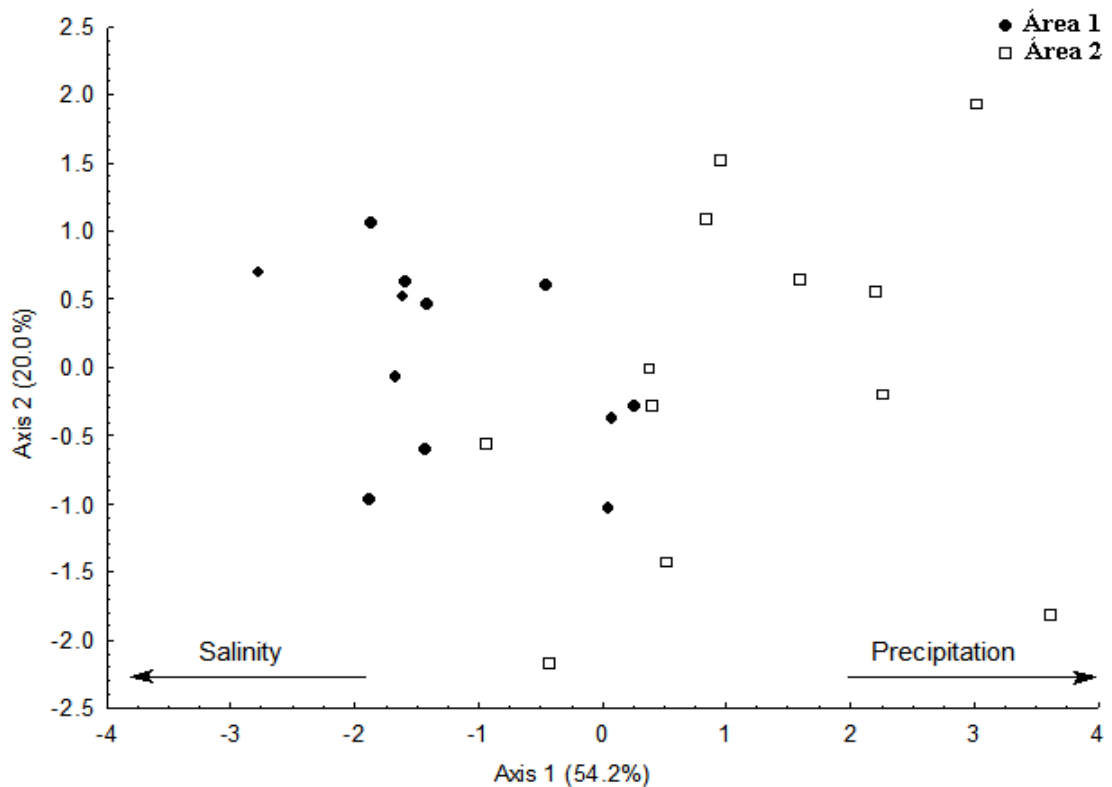


Figura 3 – Variação ambiental nos cultivos de *C. gasar* ordenadas de acordo com as áreas pela Análise de Componentes Principais (PCA).

3.2 Microscopia de Luz e Morfometria dos Túbulos

As médias dos diâmetros dos túbulos seminíferos foi crescente de acordo com a maturação gonadal, nos animais de ambas as áreas de coleta. Na área 1 os diâmetros dos túbulos variaram de 22.8 μm (± 5.2) no estágio imaturo até 64.1 μm (± 8.7) no estágio maduro. Enquanto na área 2 os diâmetros médios dos túbulos variaram de 13.6 μm (± 2.9) a 41.4 μm (± 11.2) no estágio maduro. Nos dois sítios houve redução no diâmetro médio tubular nos estádios espermiado. Observamos há diferença significativa nos diâmetros celulares entre os estádios de maturação, as células acompanham um crescimento decrescente de acordo com o avanço de maturação da gonada e devido a modificações celulares. Porém não houve diferença significativa nos diâmetros das células entre as áreas (Tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm SD) diâmetros (μm) of spermatic tubule and stem cell lines in four stages of testis maturation in *C. gasar* in Curuçá and Nova Olinda.

Estádios	Área 1				Área 2			
	IMT	EMT	MAD	ESP	IMT	EMT	MAD	ESP
TS	22.8 (\pm 5.2 ^{Aa}) n= 20	51.1 (\pm 13.3 ^{Ab}) n= 20	64.1 (\pm 8.7 ^{Ac}) n= 20	41.2 (\pm 9.2 ^{Ad}) n= 20	13.6 (\pm 2.9 ^{Ba}) n= 20	38.5 (\pm 15.0 ^{Bb}) n= 20	41.4 (\pm 11.2 ^{Bc}) n= 20	29.3 (\pm 15.0 ^{Bd}) n= 20
SG	4.0 (\pm 1.3 ^{Aa}) n= 100	3.2 (\pm 0.8 ^{Ab}) n= 100	3.2 (\pm 0.7 ^{Abc}) n= 100	3.1 (\pm 0.7 ^{Acd}) n= 100	3.9 (\pm 1.3 ^{Aa}) n= 100	3.2 (\pm 0.8 ^{Ab}) n= 100	3.1 (\pm 0.7 ^{ABc}) n= 100	3.1 (\pm 0.8 ^{ABa}) n= 100
ST	np	2.6 (\pm 0.3 ^{Ab}) n= 100	2.2 (\pm 0.3 ^{Ac}) n= 100	np	np	2.5 (\pm 0.3 ^{Ab}) n= 100	2.2 (\pm 0.3 ^{BAc}) n= 100	np
SP	np	1.1 (\pm 0.1 ^{Ab}) n= 100	1.2 (\pm 0.1 ^{Bb}) n= 100	np	np	1.2 (\pm 0.1 ^{Ab}) n= 100	1.1 (\pm 0.1 ^{Bb}) n= 100	np

A-D na mesma linha indica diferença estatística significativa entre sítios e a-d na mesma linha indica diferença estatística significativa entre estádios ($p < 0,05$). **Legenda:** espermatogônia (SG), espermatócito (ST), espermátide (SP), espermatozoide (SZ), ausência da célula (np).

3.3 Morfologia Gonadal e Imunolocalização dos Marcadores de PCNA e Caspase- 3 nos Testículos

O parênquima testicular em ambas em áreas foi caracterizado pela presença de túbulos seminíferos delgados e irregular envolvido por tecido conjuntivo. Durante a maturação sexual foram identificados quatro estádios gonadais: imaturo (Fig.4 A,E- I,M) caracterizado pela abundância de tecido conjuntivo envolvendo os túbulos espermáticos, com espermatogônias com citoplasma volumoso, núcleo arredondado com tamanhos e formato irregular aderidas a parede do túbulo. Estas células apresentaram imunomarcção para ambas proteínas (PCNA e Caspase- 3). Estádio em maturação foi observado uma redução na quantidade de tecido conjuntivo, o interior dos túbulos apresentou todos os tipos celulares de linhagem espermatogênica: espermatogônias, espermatócitos com citoplasma reduzido e núcleo elipsoide; espermátides, células com escassez de citoplasma e núcleo de cromatina condensada; e alguns espermatozoides. Neste estágio foi observado a imunomarcção em todas as células da linhagem germinativa em ambas as áreas (Fig.4 B,F-J,F). No estágio maduro apresentou

escassez de tecido conjuntivo com os túbulos espermáticos repletos de espermatozoides. Nesse estágio a imunomarcção pra Caspase -3 foi reduzida em ambas as áreas, sendo evidente em algumas espermatogônias e espermatozoides, enquanto o PCNA foi maior nos espermatozoides (Fig.4 C,G-K,O). No estágio espermiado os túbulos espermáticos apresentaram a presença de espermatogônias e espermatozoides residuais no lúmen. Houve maior imunomarcção de Caspase- 3 e PCNA nos testículos de ambas as áreas (Fig.4 D,H-L,P).

Tabela 3. Avaliação da atividade de imunomarcção das proteínas PCNA e Caspase- 3 em testículo de *C.gasar*.

Imunomarcção de acordo com estágio de maturação									
Área 1									
	PCNA				Caspase- 3				
	IMT	EMT	MAD	ESP	IMT	EMT	MAD	ESP	
SG	++	+	++	+++	+	+	+	+	
ST	np	+++	+	np	np	++	+	np	
SP	np	+++	++	np	np	++	-	np	
SZ	np	+	+++	-	np	+	+	+++	
Imunomarcção de acordo com estágio de maturação									
Área 2									
	PCNA				Caspase- 3				
	IMT	EMT	MAT	ESP	IMT	EMT	MAT	ESP	
SG	+++	+	+	++	+	+	+	++	
ST	np	+++	+	np	np	++	++	np	
SP	np	+++	+++	np	np	++	-	np	
SZ	np	+	+++	-	np	+	+	+++	

Legenda: Estádio: Imaturo (IMT), Em maturação (EMT), Maduro (MAT), Espermiado (ESP); **Tipo celular:** espermatogônia (SG), espermatócito (ST), espermatíde (SP), espermatozoide (SZ), ausência da célula (np). **Intensidade da reação:** ausente (-), leve (+), moderada (++) , acentuada (+++).

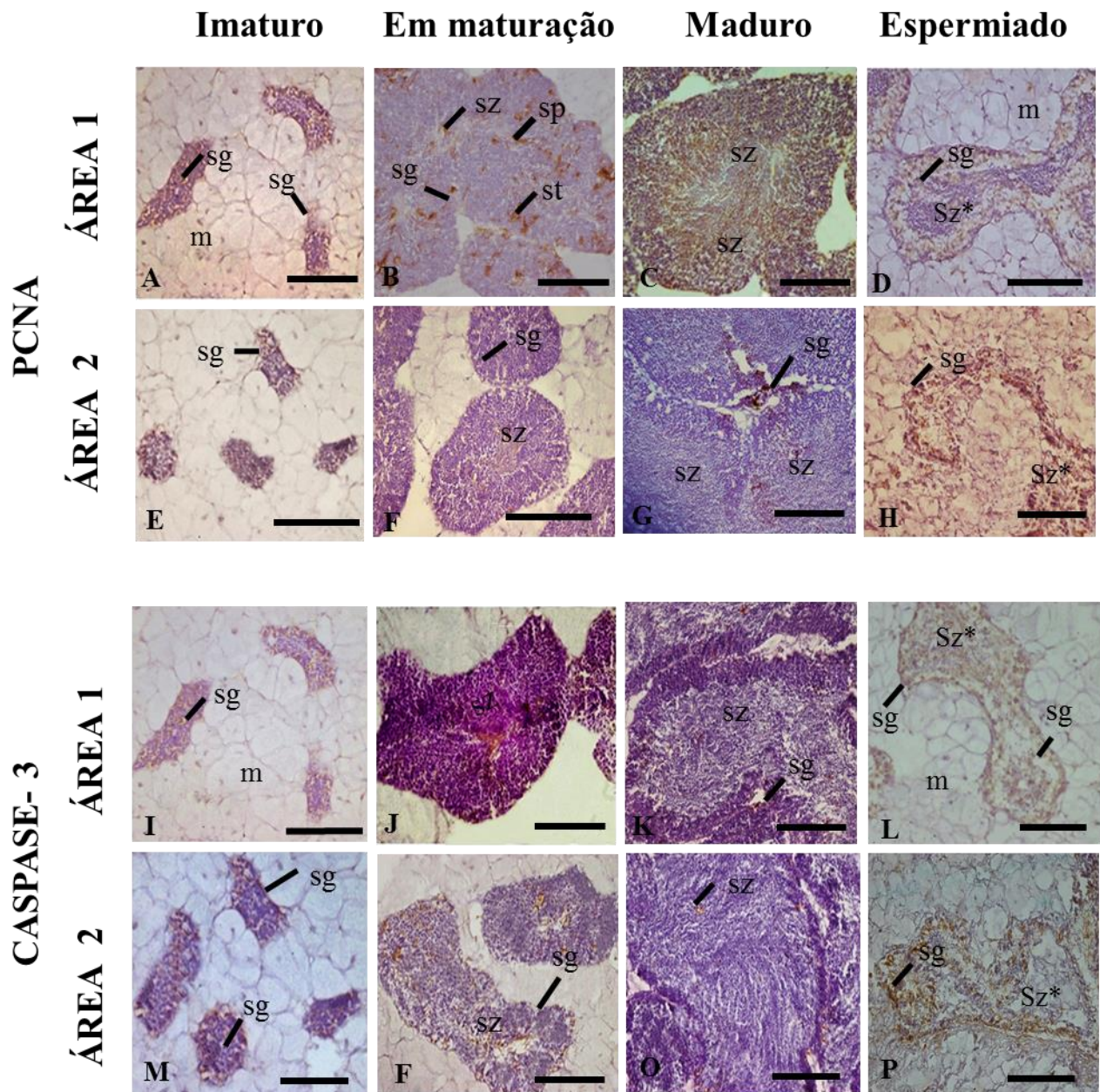


Figura 4. Imunolocalização da proteína PCNA e Caspase- 3 no testículo de *C. gasar* em diferentes estádios de maturação em duas áreas de cultivo natural. A,E- I,M. Gônada no estágio imaturo. B,F-J,F. Gônada no estágio em maturação. C,G-K,O. Gônada no estágio maduro. D,H-L,P. Gônada no estágio espermiado. Abreviações: m, manto; sg, espermatogônia; st, espermatócito; sp, espermátide; sz, espermatozoide. Escala das barras: A-P = 25µm

3.4 Índice de Proliferativo Tubular (IPT) e Apoptótico Tubular (IAT)

Foi observado a ocorrência de PCNA e Caspase- 3 em todos os estádios durante os períodos sazonais na área 1 e na área 2. Contudo a Caspase-3 apresentou imunomarcacão mais elevadas, exceto no estádio maduro na área 1 (Fig.5).

Na área 1 houve intensa atividade tanto de PCNA quanto de Caspase- 3, em proporções semelhantes em todos os estádios e períodos, se destacando nos períodos seco e o transicional seco-chuvoso, onde tiveram maior imunomarcacão para ambas proteínas (Fig. 5 A-D). Comportamento diferente foi observado na área 2, pois a ocorrência de Caspase-3 foi superior que do PCNA em todos os estádios e períodos (Fig.5 E-H). Apresentando seu ápice nos períodos seco e seco-chuvoso como na área 1.

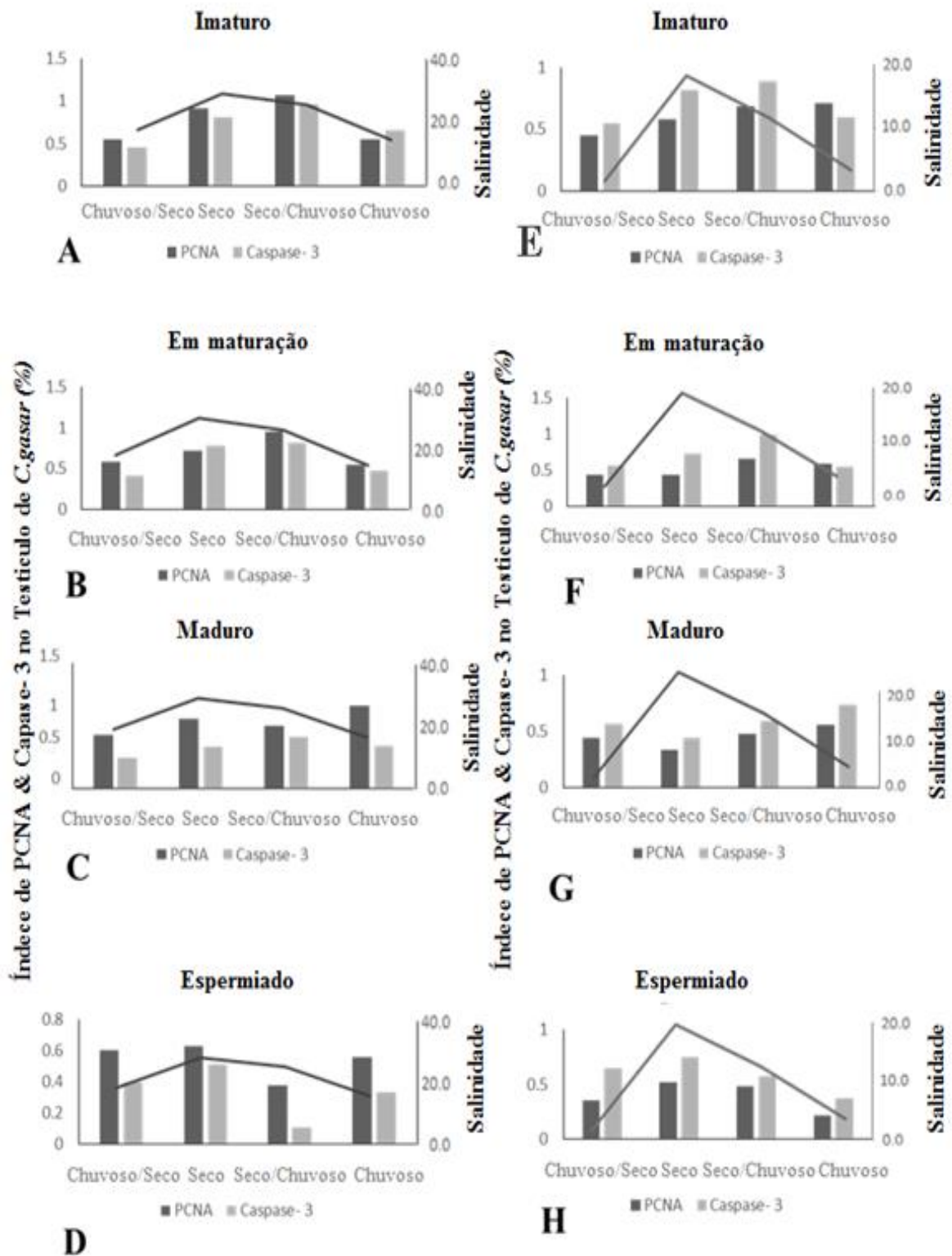


Figura 5. Índice da Imunomarcção de Caspase-3 e PCNA Celular em diferentes estádios de maturação gonadal de *C. gasar* nos quatros períodos sazonais em duas localidades nos períodos de 2009-2010. Área 1: A-D; Área 2: E-H

4. Discussão

A maturação testicular envolve atividades coordenadas entre proliferação e apoptose, que são processos essenciais para a organogênese e manutenção da homeostase tecidual nos animais, sendo importantes mecanismos para o controle da população celular (Franco *et al.*, 2010). As mudanças morfológicas nas gônadas de *C. gasar* seguem as mudanças sazonais, que no estuário amazônico é determinado pelo índice pluviométrico e pela salinidade. A pluviometria atua na regulação da salinidade e culminam no controle da produção e liberação dos gametas no ambiente (Paixão *et al.*, 2013).

No presente estudo a relação entre os fatores abióticos e a dinâmica dos processos de proliferação e morte celular durante a maturação gonadal de *C. gasar* foi relacionada com as localidades de cultivo, verificamos que área 1 apresentou media de salinidade maior e precipitação menor em relação a área 2. De acordo com a localização das áreas de cultivos observamos que a área 1 sofre mais influência do mar, pois ela está mais próxima da costa litorânea. Diferentemente área 2 que está mais distante da costa, sofre influência maior da água doce do rio. Sugerindo que a baixa concentração de salinidade está influenciando o desempenho das atividades metabólicas que foi confirmado pelos menores diâmetros médios de túbulos espermáticos durante o desenvolvimento gonadal.

A morfometria nos mostrou que na área 1, onde foi observado variação de 24,3 a 33,5, os túbulos seminíferos são maiores em relação aos da área 2. Acreditamos que a salinidade contribuiu para a proliferação das células espermáticas, com essa alta atividade os túbulos encontram-se mais expandidos. Sabendo-se que em ambientes tropicais a salinidade é apontada como um dos principais fatores que influenciam na atividade reprodutiva das ostras. Segundo Paixão *et al.*, (2013) o estresse salino é necessário para induzir a desova em *C. gasar*.

Diferentemente na área 2, que a salinidade varia de 14,2 a 19,2, esta região apresentou indivíduos com os diâmetros dos túbulos menores. Que sugerimos que há menos proliferação de células, que pode estar relacionada a baixa salinidade, que de acordo com Santerre e colaboradores (2013), pode ocasionar um atraso na maturação dos gametas, bem como na liberação dos mesmos. Em contrapartida, não houve diferença nos diâmetros das células espermatogênicas entre os sítios.

As mudanças morfológicas quanto a proliferação e crescimento tecidual observadas neste trabalho, foram semelhantes aos achados de Franco e colaboradores em seu estudo com a reprodução de *C. gigas* (Franco *et al.*, 2010) e também em estudos feitos por Motta e colaboradores (2013) nas gônadas de outras espécies de moluscos.

Acreditamos que esse cenário pode estar relacionado as condições nutricionais do ambiente que favorece a energia às células e por consequência interfere no crescimento dos túbulos seminíferos de *C. gasar*. Está hipótese é confirmada pelo estudo de Sampaio, Tagliaro, Schneider & Beasley (2017), onde comprova que entre os níveis de 30 e 35 de salinidade favorece o crescimento e sobrevivência de *C.gasar*, assim como Franco e colaboradores observaram que os túbulos espermáticos de *C. gigas* se expandem com o aumento da atividade do PCNA.

As diferenças de variações de salinidade refletiram no comportamento dos índices de atividade de PCNA e Caspase- 3. Na área 1 houve equivalência entre as proteínas. Exceto no estágio maduro e espermiado. Onde o estágio maduro, que encontra-se predominantemente no período chuvoso e transicional chuvoso-seco, , porém apesar de se encontra na baixa salinada (24,3) observamos que neste momento houve redução da atividade Caspase-3 e maior para PCNA, Acreditamos que aumento do PCNA na área área 1 ocorra devido a sua proximidade ao mar, isto proporciona uma descarga maior de nutriente ao ambiente., logo essas condições nutricionais favoráveis podem permitir a intensa proliferação celular e o amadurecimento da gônada de *C. gasar*. Alguns autores estabeleceram que o fitoplâncton é a fonte alimentar e energética dos moluscos bivalves (Devakie & Ali, 2000; Deng et al., 2013).

Diferentemente da área 2, onde no mesmo período sazonal a menor salinidade é 14.2, podemos observar que a atividade da Caspse-3 permanece superior em comparação a atividade do PCNA. Esses comportamentos distintos reforçam nossa hipótese que áreas com índices salinos altos e recursos nutricionais proporcionam um ambiente saudável para as ostras cultivadas.

Em contrapartida, nos períodos seco e no transicional seco-chuvoso, com salinidade elevada, onde encontramos predominantemente os indivíduos no estágio espermiado, observamos a equivalência dos IPT e IAT para as atividades de PCNA e Caspase-3 da área 1, onde a máxima da saline foi 33.2, o que leva a credita a salinidade pode influenciar nesse processo. Então, acreditamos que a salinidade e interfere diretamente no proliferação e desenvolvimento das células, favorecendo a mortalidade das células defeituosas durante as fases iniciais da espermatogênese e residuais após a espermição. Esses argumentos são reforçados pelas observações feitas por Franco et al., (2008) em *Crassostrea gigas* e Huo e colaboradores (2014) em *Crassostrea hongkongensis*, onde foi verificado o papel dessas proteínas na manutenção da homeostase do tecido, auxiliando na regeneração dos túbulos seminíferos.

O mesmo não ocorre na área 2, onde no mesmo período, a máxima faixa salina de 19,2 não foi suficiente para que ocorresse e essa equivalência entre os índices, pois observamos a prevaleceu atividade da Caspase-3 em relação ao PCNA. Com isso sugerimos que a baixa salinidade pode interferir na produção de gametas, sabendo-se que segundo Bane e colaboradores 2007 e Urian, Hatle & Gilg (2011) relatam impactos negativos na taxa de filtração, aumento no metabolismo anaeróbico e a mortalidade do animal provocados pela baixa salinidade.

Concluimos que salinidade e precipitação foram os parâmetros que mais se diferenciaram significativamente entre as áreas, ao longo de todo o estudo. Constatou-se que estas variações interferem tanto no desenvolvimento da gônada do animal quanto na maturação dos gametas. Essas informações podem contribuir para o manejo reprodutivo de *C. gasar* na região amazônica, pois a área 1 apresenta melhores condições para desenvolvimento e reprodução da espécie. Esses achados estabelecem que nos ambientes estuarinos, salinidade e precipitação interferem na atividade das células testiculares de *C. gasar* e no sucesso reprodutivo da espécie.

Agradecimentos

Agradecemos especialmente à FAPESPA, pelo apoio financeiro da pesquisa, à CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos e à Sra. Lia Sogabe, técnica das Técnicas de Histologia da UFPA.

Referencias

- ABEELS, H.A., LOW, A.N. & VOLETY, A.K. 2012. Trophic transfer and habitat use of oyster *Crassostrea virginica* reefs in southwest. Florida, identified by stable isotope analysis. *Marine Ecology. Progress Series* **462**: 125–142.
- AFINOWI, M.A. 1984. The mangrove oyster, *Crassostrea gasar* cultivation and potential in the Niger Delta (Nigeria). *Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research*, **14**(1): 1-13.
- ALVARENGA, L., NALESSO, R.C. 2006. Preliminary assessment of the potential for mangrove oyster cultivation in Piraque–acu river estuary (Aracruz, ES). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **v.49**, p.163–169.
- ALVAREZ, I.F. 1991. Reproduccion y Acondicionamiento de Bivalves em El criadero. *Conselleria de Pesca, Marrisqueo e Acuicultura*. Xunta de Galicia Coruña, Espana. **v.16**, P. 3-35.
- ANDERSON, M.J. 2001. A New Method for Non-parametric Multivariate Analysis of Variance. *Austral Ecology* **26**: 32-46.
- ARAVIND, L., DIXIT, V.M., KOONIN, E.V. 2001. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in Vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* **291**:1279–1284.
- BARNES, T., VOLETYA, CHARTIER, K., MAZZOTTI, F. & PEARLSTINE L. 2007. A Habitat Suitability Index Model for the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*), a Tool for Restoration of the Caloosahatchee Estuary, Florida. *Journal of Shellfish Research*. **26**: 949–959.
- BERRÊDO, J.F.J., COSTA, M.L., PROGNE, M.D.P.S., 2008. Efeitos das variações sazonais do clima tropical úmido sobre as águas e sedimentos de manguezais do estuário do rio Marapanim, costa nordeste do Estado do Pará. *Acta Amaz.* **38**, 473–482
- CÁCERES–PUIG, J.I., ABASOLO–PACHECO, F., MAZÓN–SUASTEGUI, J.M., MAEDA–MARTÍNEZ, A.N. & SAUCEDO, P.E. 2007. Effect of Temperature on Growth and Survival of *Crassostrea corteziensis* Spat During late–nursery Culturing at the Hatchery. *Aquaculture*, **v.272**, p.417–422,
- CHRISTO, S.W. & ABSHER, T.M., 2006. Reproductive Period of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná, Brazil. *Journal Coastal Research* vol. **2**, 1215–1218.
- CLEM, R.J., HARDWICK, J.M. & MILLER, L.K. 1996. Anti-apoptotic genes of *baculoviruses*. *Cell Death Differ.* **3**:9–16.
- DENG, Y., FU, S., LIANG, F., DU, X., XIE, S. 2013 Growth and Survival of Pearl Oyster *Pinctada Maxima* Spat Reared Under Different Environmental Conditions. *Journal of Shellfish Research*, **32**(3): 675-679.

DEVAKIE, M.N. & ALI, A.B. 2000 Salinity-Temperature and Nutritional Effects on the Setting Rate of Larvae of the Tropical Oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). *Aquaculture*, **184**(1): 105-114.

ENRÍQUEZ-DÍAZ M., POUVREAU S., CHÁVEZ-VILLALBA J., LEPENNEC M. 2009. Gametogenesis, Reproductive Investment and Spawning Behavior of the Pacific giant Oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an Environment-Dependent Strategy. *Aquaculture Institute*. **17**, 491-506.

FAO. 2017. FAO Fisheries & Aquaculture - Fishery Statistical Collections - Global Aquaculture Production [Cited 02 Oct 2017] Available from URL <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>.

FESUS, L.P., DAVIES J.A., PIACENTINI M. Apoptosis: Molecular Mechanisms in Programmed Cell Death. *European Journal of Cell Biology*. **56**:170–177, 1991.

FISCH, G., MARENGO, J.A., NOBRE, C.A., 1998. Uma Revisão Sobre o Clima da Amazonia. *Acta Amaz.* **28**, 25. doi:101-126.1998

FRANCO, A., HEUDE BERTHELIN, C., GROUX, D., SOURDAINE, P., MATHIEU, M. 2008. Fine Structure of the Early Stages Spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell*. **v.40**, P.251-260.

FRANCO, A., JOUAUX, A., MATHIEU, M., SOURDAINE, P., LELONG, C., Kellner, K., HEUDE BERTHELIN, C., 2010. Proliferating Cell Nuclear Antigen in Gonad and Associated Storage Tissue of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: Seasonal Immunodetection and Expression in Laser Microdissected Tissues. *Cell Tissue Research*. **340** (1), 201–210.

GARCÍA-GASCA, A., LEAL-TARIN, B., RÍOS-SICAIROS, J., HERNÁNDEZ-CORNEJO, R., AGUILAR-ZÁRATE, G., BETANCOURT-LOZANO, M. 2012. Follicular Apoptosis in the Mussel (*Mytella strigata*) as Potential Indicator of Environmental Stress in Coastal Ecosystems. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. **v20**. 2012.

GOSLING, E., 2003. Bivalve Mollusks: Biology, Ecology and Culture. Reproduction, Settlement and Recruitment. Fishing News Books, Oxford-UK, pp. 131–161.

HANSELMANN, R., SMOLOWITZ, R., GIBSON, D. Immunochemical Localisation of Proliferating Cells in Mussel Digestive Gland Tissue. *The Histochemical Journal*. **31**:781–788, 2000.

HUANG, S., HSIEH, H., CHEN, C.P. 2006. Effects of the Winter Monsoon on the Growth, Mortality, and Metabolism of Adult Oyster in Kinmen Island, Taiwan. *Aquaculture*, **v.251**, p.256–270.

HUO, Z., WANG, Z., LIANG, J., ZHANG, Y., SHEN, J., YAO, T., SU, J., YU, R., 2014. Effects of Salinity on Embryonic Development, Survival, and Growth of *Crassostrea hongkongensis*. *The Journal of Ocean University of China*. **China 13**, 666–670.

INMET — Instituto Nacional de Meteorologia, 2010. Conventional monitoring stations. Available at: <http://www.InMet.gov.br/yes/sonabra/ionaConventionis> (Access in January 2016)

KURKI P., LOTZ M., OGATA K. & TAN E. M. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA/cyclin) in Activated Human T Lymphocytes. *Journal of Immunology*. **138**, 4114, 1987.

LAPÈGUE, S., BOUTET, I., LEITÃO, A., HEURTEBISE, S., GARCIA, P., THIRIOTUIE-VREUX, C. & BOUDRY, P. 2002 Trans-Atlantic Distribution of a Mangrove Oyster Species Revealed by 16S mtDNA and Karyological Analyses. *Biological Bulletin*. **202**(3): 232-242.

LEGENDRE, P. & LEGENDRE, L.. 2012. *Numerical Ecology*, 2nd English ed. Elsevier, 853-1006 pp.

LOPES, G.R., GOMES, C.H.A.M., TURECK, C.R., MELO, C.M.R., 2013. Growth of *Crassostrea gasar* Cultured in Marine and Estuary Environments in Brazilian Waters. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **48** (7), 975–982.

LUCAS, J.S. 2008. Environmental Influences. In: SOUTHGATE, P.C. e LUCAS, J.S. The Pearl Oyster. *Oxford: Elsevier*. p.187-228.

MAGA G, HUBSCHER U. 2003. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): A Dancer With Many Partners. *Journal Cell Science*. **116**:3051–3060.

MENDES, A. C., 2005. Geomorfologia e sedimentologia. In: Marcus E. B. Fernandes. (Org.). Os manguezais da costa norte brasileira. Belém: Petrobrás/Fundação Rio Bacanga, v. 2, p. 13-32.

MCFARLAND, K., L. DONAGHY, & A.K. VOLETY. 2015. Effect of Acute Salinity Changes on Hemolymph Osmolality and Clearance Rate of The Non-Native Mussel, *Perna viridis*, and the Native Oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions*. **8**: 399–310.

MIRANDA, L.B., 2002. Princípios de Oceanografia Física de Estuários Vol. 42. Edusp, 411p.

MORAES, B.C. DE, COSTA, J.M.N. DA, COSTA, A.C.L. DA, COSTA, M.H., 2005. Variação espacial e temporal da precipitação no Estado do Pará. *Acta Amaz.* **35**, 207–214.

MOTTA, C. M.; FREZZA, V.; SIMONIELLO, P. Caspase 3 in Molluscan Tissues: Localization and Possible Function. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, v. **319**, n. 10, p. 548-559, 2013.

PAIXÃO, L., FERREIRA, M.A., NUNES, Z., FONSECA-SIZO, F. & ROCHA, R. 2013 Effects of Salinity and Rainfall on the Reproductive Biology of the Mangrove Oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the Collection of Broodstock oysters. *Aquaculture*, **6**(12): 380-383.

PATERSON, K.J.; SCHREIDER, M.J.; ZIMMERMAN, K.D. 2003. Anthropogenic Effects on Seston Quality and Quantity and the Growth and survival of Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*) in Two Estuaries in NSW, Australia. *Aquaculture*, v.**221**, p.407 423.

- PAUNESKU, T., MITTAL, S., PROTIC, M., ORYHON, J., KOROLEV, S.V, JOACHIMIAK, A., WOLOSCHAK, G.E. 2001. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): Ringmaster of the Genome. *International Journal of Radiation Biology*. **77**:1007–1021.
- PEREIRA, O.M., MACHADO, I.C., HENRIQUES, M.B., YAMANAKA, N., 2001. Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarina-lagunar de Cananéia-SP (25oS, 48oW). *Bol. do Inst. Pesca* **27**, 163–74.
- PINTO-COELHO, R.M., HAVENS, K., 2015. Crise nas Águas: Educação, ciência e governança juntos evitando conflitos gerados pela escassez e pela perda da qualidade das águas, 1st ed. Belo Horizonte. doi:978-85-61502-05-8 1.
- PROPHET, E.B. 1995. Métodos Histotecnológicos. *Washington (DC): Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP)*. 280p.
- ROSARIO, R.P., BEZERRA, M.O., VINZON, S.B., 2009. Dynamics of the saline front in the northern channel of the Amazon river - influence of fluvial flow and tidal range (Brazil). *J. Coast. Res.* **2**, 1414–1418
- SAMPAIO, D.S., TAGLIARO, C.H., SCHNEIDER, H. & BEASLEY, C.R. 2017. Oyster Culture on the Amazon Mangrove Coast: Asymmetries and Advances in an Emerging Sector. *Reviews in Aquaculture*. **v. 0**, 1–17.
- SCHULZ, R.W. & NOBREGA, R. H. 2011. Regulation of Spermatogenesis. In: Farrell AP, editor. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. San Diego: Academic Press. **v. 1**: 627-634.
- SOKOLOVA, I. M., EVANS, S., HUGHES, F. M. 2004. Cadmium-induced Apoptosis in Oyster Hemocytes Involves Disturbance of Cellular Energy Balance But no Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of Experimental Biology*, **v. 207**, n. 19, p. 3369-3380.
- SOUZA-FILHO, P.W.M., LESSA, G.C., COHEN, M.C.L., COSTA, F.R., LARA, R.J., 2009. The Subsiding Macrotidal Barrier Estuarine System of the Eastern Amazon Coast, Northern Brazil, in: *Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 347–375.
- SUNILA, I. & LABANCA, J. 2003. Apoptosis in the Pathogenesis of Infectious Diseases of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. **56**: 163–170.
- UEDA, I., I. SAKAGUCHI, T. OGITA, C. YAMADA, & ITANI, G. 2013. Thermal Conditions of Overwintering for Tropical Green Mussel *Perna viridis* in Uranouchi Inlet, Tosa Bay, Shikoku, Japan. *The Sessile Organisms Society of Japan*. **30**: 29–36.
- URIAN, A.G., HATLE, J.D. & GILG, M.R. 2011. Thermal Constraints for Range Expansion of the Invasive Green Mussel, *Perna viridis*, in the Southeastern United States. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **315**: 12–21.
- YERETSSIAN, G., LABBE, K., SALEH, M. 2008. Molecular Regulation of Inflammation and Cell Death. *Cytokine*. **43**: 380-390.

YUKIHIRA, H., LUCAS, J.S., KLUMPP, D.W. 2006. The Pearl Oysters, *Pinctada maxima* and *P. margaritifera*, Responde in Different Ways to Culture in Dissimilar Environments. *Aquaculture*, v.**252**, p.208-224.