

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDOS
ECOTOXICOLÓGICOS EM MOLUSCOS
BIVALVES E PEIXES**

JULIANO ZANETTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Co-orientador: Dr. John J. Stegeman

Florianópolis, Agosto de 2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

Z28i Zanette, Juliano
Identificação e caracterização de marcadores moleculares
para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves
e peixes [tese] / Juliano Zanette ; orientador, Afonso
Celso Dias Bainy. - Florianópolis, SC, 2009.
172 f. : 33 il., 24 tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Inclui bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Poecilia. 3. CYP. 4. Citocromo
P450. 5. PCB. 6. Crassostrea. 7. Fundulus. 8. Expressão
genica. 9. Ecotoxicologia. I. Bainy, Afonso Celso
Dias. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

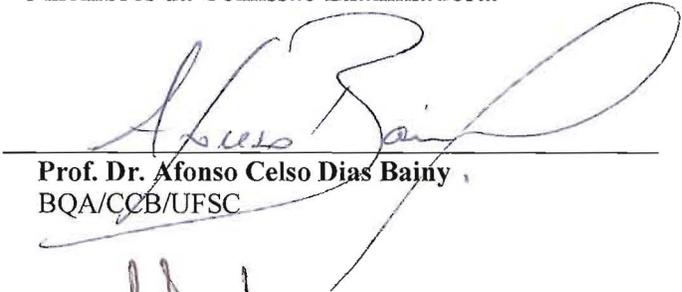
CDU 577.23

**“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES PARA ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS EM MOLUSCOS
BIVALVES E PEIXES”**

POR
JULIANO ZANETTE

Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador
e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:

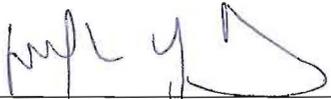


Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy
BQA/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. José Maria Monserrat
DCF/CCF/FUFRG



Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
FIOCRUZ



Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi
BQA/CCB/UFSC



Prof. Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo
AQI/CCA/UFSC

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
*Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC*

Florianópolis, Agosto de 2009.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Dilson e Sonia por todo o apoio e companheirismo;
- Ao Prof. Dr. Afonso por ter me orientado, aconselhado, incentivado, apoiado nas horas decisivas, e que tornou possível minha ida para um centro de pesquisa de excelência no exterior, valeu por tudo Bainy;
- Ao Dr. John Stegeman por ter me co-orientado e me aceito como integrante do seu grupo de pesquisa no Woods Hole Oceanographic Institution. Obrigado pelo voto de confiança e por todo o apoio e ensinamentos;
- Aos meus familiares, vó Dilma, vô Fidelis, vó Rosa e vô Bepe e todos seus descendentes que são muitos;
- Ao Fabrício, que além de parceiro nas pesquisas, se tornou um grande amigo, e sua ajuda foi fundamental para o sucesso do estudo realizado em campo em SJ. Espero que possamos trocar muito mais idéias no trabalho, gargalhadas e momentos de surf. Valeu irmão!
- Ao Igor pelo apoio no estudo, e por dar um importante *start* nos estudos moleculares com ostra. Além de amigo, foi um exemplo de batalhador que procurei seguir nessa jornada;
- A prof^a. Dr^a. Maria Risoleta, que tem acompanhado e participado de várias etapas dessa minha caminhada científica, obrigado por tudo;
- Aos colegas de laboratório, pelos momentos de descontração, conversas científicas e festas durante esses quatro longos anos. Ao Guilherme, Tarquin e Bel pelo apoio nas técnicas moleculares. Ao Jacó, por fornecer cDNA de *Poecilia*. Aos colegas de laboratório, Karim, Ana, Marília, Ninna, Ju, Dani, Talita, Maya e Pedro;
- Ao Bruce Woodin, o americano mais brasileiro e gente fina que eu conheci e que me deu um grande apoio em Woods Hole. Ao Dr. Matt Jenny, um pesquisador exemplar, pelos ensinamentos e pescarias de caiaque. Ao Dr. Jared Goldstone pela atenção dispendida, e auxílio nas análises filogenéticas realizadas.
- Aos pesquisadores/alunos do laboratório do Dr. John Stegeman: Rita, Maria, Saimi e Lauren, do Dr. Mark Hahn: Sibel, Diana, e Neil, Ann, Lars e Adam. Ao carioca da gema Thiago Parente, pela ajuda no lab, e por montarmos uma república Brasileira lá, valeu merrrrrmão!;
- A Cynthia e aos amigos Rui, Lu, Pedro, Raquel, Fernando, Jurema e Kiko por me acompanharem nesta caminhada;
- Aos amigos que fiz em Woods Hole: Neil, Adrian, Janny, Jeff, Cris, Jerum, Lars, Hannah, Luciano, Bibiana, Adam, Brian e Cristina;

- Ao Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC, especialmente ao Prof. Cláudio, pela identificação, fornecimento das ostras utilizadas neste trabalho e ao Prof. Jaime pelos comentários para a tese;
- Ao grupo do Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO-USP, pelas análises de contaminantes orgânicos, Márcia Bicego, Rosalinda Montone, Satie Taniguchi e Silvio Sasaki. Em especial ao Silvio e Satie, pela parceria e atenção, quando passei duas semanas realizando estágio neste laboratório;
- Ao grupo do Laboratório de Hidoquímica da FURG, em especial ao Prof. Dr. Luis Felipe Hax Niencheski, por cordenar as análises de metais;
- Ao EPA (Agência de Proteção Ambiental Americana) pelas análises de PCBs em *Fundulus heteroclitus*;
- Ao Laboratório de Oceanografia Costeira da UFSC, ao Prof. Dr. Jarbas Bonetti, Bianca e Diego pela participação nas coletas e análises hidroquímicas;
- Ao Djan Porrua de Freitas, Químico responsável da empresa QMC Saneamento Ltd, pelas análises microbiológicas;
- Aos funcionários da Escola do Mar, da Secretaria de Educação da Prefeitura Municipal de São José;
- Ao grupo do Prof. Dr. Edmundo Grisard pelo sequenciamento de amostras de ostra-do-mangue;
- A Joice, do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia por toda a atenção;
- Ao CNPq - Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento através dos editais CT-Hidro (Processo 500088/2006-3), Universal (Processo 484328/2006-9) e pela bolsa de Doutorado Sanduíche;
- A CAPES pela bolsa de doutorado no Curso de Pós-graduação em Biotecnologia;
- A todos aqueles que incansavelmente buscam a iluminação pelo conhecimento. E a todos aqueles que usam e transmitem este conhecimento adquirido com a meta de tornar o mundo um lugar com menos injustiças, mais oportunidades e possibilidades;
- A DEUS !

SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS.....	1
2. RESUMO.....	4
3. ABSTRACT.....	6
4. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
4.1. Aplicações biotecnológicas e tóxicológicas no estudo de organismos aquáticos.....	8
4.2. A poluição marinha.....	10
4.3. O uso de organismos aquáticos no monitoramento ambiental.....	12
4.4. Os biomarcadores de contaminação aquática.....	13
4.5. A biologia molecular como ferramenta na identificação de novos biomarcadores.....	16
5. OBJETIVOS GERAIS... ..	18
6. CAPÍTULO I. Alterações bioquímicas e moleculares em ostra-do-mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> expostas a uma região contaminada por esgoto doméstico....	19
6.1. INTRODUÇÃO.....	20
6.1.1. Características da ostra-do-mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding 1828).....	20
6.1.2. A problemática do esgoto doméstico.....	21
6.1.3. Uso de bivalves em estudos ecotoxicológicos.....	22
6.2. OBJETIVOS.....	25
6.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
6.3.1. Experimento em campo.....	26
6.3.2. Monitoramento hidroquímico e microbiológico no experimento de campo....	28
6.3.3. Análises químicas em <i>C. rhizophorae</i>	28
6.3.4. Análises de biomarcadores bioquímicos em <i>C. rhizophorae</i>	30
6.3.5. Identificação de genes diferencialmente expressos em <i>C. rhizophorae</i> expostas ao esgoto doméstico utilizando a técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH).....	31
6.3.6. Uso de iniciadores para identificação de novos genes em <i>C. rhizophorae</i> por PCR.....	33
6.3.7. Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	35
6.4. RESULTADOS.....	36
6.4.1. Monitoramento físico, químico e microbiológico da área de estudo.....	36
6.4.2. Monitoramento de contaminantes orgânicos e metais nas ostras.....	38
6.4.3. Análises de biomarcadores bioquímicos.....	41
6.4.4. Identificação de novos genes biomarcadores de esgoto doméstico in situ utilizando a técnica de SSH.....	44
6.4.5. Identificação de novos genes biomarcadores em <i>C. rhizophorae</i> por PCR.....	48
6.4.6. Análise quantitativa de expressão gênica de <i>CAT</i> , <i>MDR</i> , ferritina e cavortina.....	50
6.5. DISCUSSÃO.....	52
6.5.1. Monitoramento dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos nos locais de estudo.....	53
6.5.2. Avaliação do uso de biomarcadores de esgoto doméstico em <i>C. rhizophorae</i> ...	56
6.5.3. Identificação de novos genes em <i>C. rhizophorae</i> com potencial aplicação para estudos ecotoxicológicos.....	60
6.5.4. Análise quantitativa de expressão gênica de <i>CAT</i> , <i>MDR</i> ,	

ferritina e cavortina.....	69
6.6. CONCLUSÕES.....	71
7. CAPÍTULO 2. Identificação de genes de citocromos P450 (CYP) em moluscos bivalves e caracterização da expressão de novos genes <i>CYP1-like</i>, <i>CYP3-like</i> e <i>CYP26-like</i> no mexilhão <i>Mytilus edulis</i>.....	73
7.1. INTRODUÇÃO.....	74
7.1.1. Características do bivalve <i>Mytilus edulis</i> (Linneus, 1758).....	74
7.1.2. Citocromos P450 (CYPs) – uma superfamília.....	75
7.2. OBJETIVOS.....	78
7.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
7.3.1. Busca por CYPs em bancos de ESTs de bivalves.....	79
7.3.2. Identificação e clonagem de novos genes <i>CYP1-like</i> , <i>CYP3-like</i> e <i>CYP26-like</i> em <i>M. edulis</i>	79
7.3.3. Análises filogenéticas de novos genes CYPs de <i>M. edulis</i> clonados.....	81
7.3.4. Coleta, aclimação e experimento em laboratório com <i>M. edulis</i>	82
7.3.5. Expressão gênica dos <i>CYP-like</i> em diferentes órgãos de <i>M. edulis</i> e indução por agonistas do receptor AhR.....	85
7.4. RESULTADOS.....	87
7.4.1. Busca por CYPs em bancos de ESTs de bivalves.....	87
7.4.2. Identificação e clonagem de novos genes <i>CYP1-like</i> , <i>CYP3-like</i> e <i>CYP26-like</i> em <i>M. edulis</i>	90
7.4.3. Análise filogenética de <i>CYP1-like</i> , <i>CYP3-like</i> e <i>CYP26-like</i> em <i>M. edulis</i>	92
7.4.4. Expressão de genes <i>CYP-like</i> em diferentes órgãos de <i>M. edulis</i>	98
7.4.5. Expressão de genes <i>CYP-like</i> em <i>M. edulis</i> e indução por agonistas do receptor AHR.....	99
7.5. DISCUSSÃO.....	101
7.5.1. Busca por novos CYPs em bancos de ESTs de bivalves.....	101
7.5.2. Análise das sequências de <i>CYP1-like</i> , <i>CYP3-like</i> e <i>CYP26-like</i> em <i>Mytilus edulis</i>	103
7.5.3. Expressão gênica de CYPs no mexilhão <i>Mytilus edulis</i> e indução por contaminantes.....	107
7.6. CONCLUSÕES.....	115
8. CAPÍTULO 3. Identificação e caracterização de novos genes de citocromos P450 da família 1 (<i>CYP1</i>) em peixes utilizados como modelo em estudos ambientais (<i>Fundulus heteroclitus</i> e <i>Poecilia vivipara</i>).....	117
8.1. INTRODUÇÃO.....	118
8.1.1. Características do peixe <i>Fundulus heteroclitus</i> (Linneus, 1766).....	118
8.1.2. Características do peixe <i>Poecilia vivipara</i> (Bloch & Schneider, 1801).....	119
8.1.3. Citocromos P450 da família 1 (<i>CYP1</i>).....	119
8.2. OBJETIVOS.....	123
8.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	124
8.3.1. Coleta, aclimação e exposição de <i>Fundulus heteroclitus</i> em laboratório.....	124
8.3.2. Caracterização dos locais de coleta e análise PCBs em <i>F. heteroclitus</i>	125
8.3.3. Identificação e clonagem de novos genes <i>CYP1s</i> em <i>F. heteroclitus</i>	126
8.3.4. Identificação e clonagem de novos genes <i>CYP1s</i> em <i>P. vivipara</i>	128
8.3.5. Análises filogenéticas de novos genes <i>CYP1s</i> em <i>F. heteroclitus</i> e <i>P. vivipara</i>	129
8.3.6. Análise de expressão gênica quantitativa para os <i>CYP1s</i> em <i>F. heteroclitus</i> ...	129
8.4. RESULTADOS.....	131
8.4.1. Clonagem de três novos genes de citocromo P450 da família 1 (<i>CYP1B1</i> , <i>CYP1C2</i> e <i>CYP1D1</i>) em <i>F. heteroclitus</i>	131
8.4.2. Análise das sequências <i>CYP1s</i> em <i>F. heteroclitus</i>	131
8.4.3. Expressão gênica de <i>CYP1s</i> em diferentes órgãos de <i>F. heteroclitus</i>	135

8.4.4. Efeitos do PCB126 na expressão de <i>CYP1s</i> em diferentes órgãos de <i>F. heteroclitus</i>	137
8.4.5. Expressão basal de <i>CYP1s</i> e indução em laboratório por PCB126 em duas populações de <i>F. heteroclitus</i>	138
8.4.6. Indução de <i>CYP1s</i> por PCB126 em duas populações de <i>F. heteroclitus</i> provenientes de locais com diferentes históricos de contaminação.....	140
8.4.7. Clonagem de genes <i>CYP1s</i> responsivos a contaminantes agonistas do AHR em <i>P. vivipara</i>	140
8.5. DISCUSSÃO.....	142
8.5.1. Identificação de novos genes <i>CYP1s</i> em <i>F. heteroclitus</i>	142
8.5.2. Expressão órgão-específica de <i>CYP1s</i> em <i>F. heteroclitus</i>	143
8.5.3. Resposta órgão-específica dos <i>CYP1s</i> para PCB126 em <i>F. heteroclitus</i>	145
8.5.4. Expressão gênica de <i>CYP1s</i> em duas populações de <i>killifish</i> expostas a diferentes históricos de contaminação por PCB.....	147
8.5.5. Identificação de <i>CYP1s</i> em <i>P. vivipara</i>	149
8.6. CONCLUSÕES.....	151
9. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	153
10.REFERÊNCIAS.....	156

1. LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC	do inglês: <i>ATP Binding Cassete</i> (família de glicoproteínas transmembranas)
AChE	acetilcolinesterase
ACT	actina
AHR	do inglês: <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> (receptor de hidrocarboneto aromático)
ANOVA	análise de variância (teste estatístico)
ARNT	translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto aromático
ATP	trifosfato de adenosina
BLAST	do inglês: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (algoritmo para comparação de sequências biológicas utilizando alinhamento local)
BLASTn	busca em um banco de sequências nucleotídicas a partir de uma sequência nucleotídica utilizando o algoritmo BLAST
BLASTx	busca em um banco de sequências de proteínas a partir de uma sequência de nucleotídeos traduzida, utilizando o algoritmo BLAST
BLOSUM62	modelo de matriz de similaridade de aminoácidos
BNF	beta-naftoflavona
CAP3	programa utilizado para montagem de sequências nucleotídicas
CAR	do inglês: <i>Constitutive Androstane Receptor</i> (receptor androsteno constitutivo)
CAT	catalase
cDNA	sequência nucleotídica complementar de DNA
Clustalw	programa de alinhamento de sequências múltiplas
CONAMA	Comissão Nacional do Meio Ambiente
CYP	citocromo P450
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DDD	diclorodifenildicloroetano
DDE	dicloro-difenil-dicloroetileno
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
DEHP	dietilexilftalato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDCs	desreguladores endócrinos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EF1	fator de elongação 1
EGF	fator de crescimento epidermal
EPA	Agência de Proteção Ambiental Americana
EROD	etoxiresorufina- <i>O</i> -deetilase
EST	do inglês: <i>Expressed Sequence Tags</i> (sequência nucleotídica expressa)
FABP	proteína ligante de ácidos graxos
FICZ	6-formilindolo [3,2-b] carbazol
FMO	flavina-monoxigenase
G6P	glicose-6-fosfato
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
GenBank	banco de genes público que possui os dados produzidos pelo NCBI
GPS	sistema de posicionamento global
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GST-O	glutathiona <i>S</i> -transferase, isoforma ômega
GST	glutathiona <i>S</i> -transferase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio

HCH	hexaclorociclohexano
HMM	do inglês: <i>Hidden Markov Model</i> (modelo escondido de Markov)
KCl	cloreto de potássio
LAB	alquilbenzeno linear
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos, CCA, UFSC
LPS	lipopolissacarídeos
MALD	Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser
MAO	monoamina oxidase
MCs	proteínas mitocondriais carreadoras de soluto
MDR	proteína de resistência a múltiplas drogas
MRP	proteína de resistência a múltiplas drogas
MXR	proteína de resistência a múltiplos xenobióticos
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBH	New Bedford Harbor, Massachusetts, EUA
NCBI	do inglês: <i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA)
NMP	número mais provável
N-NH ₄	amônia
N-NO ₂	nitrito
N-NO ₃	nitrato
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OC	organoclorado
PAH	hidrocarboneto policíclico aromático
PCB	bifenila policlorada
PCB126	3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila
PCDD	dibenzo-p-dioxina
PCDF	dibenzofuranos
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR-RFPL	do inglês: <i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PgP	glicoproteína P
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
POPs	poluentes orgânicos persistentes
PPCPs	do inglês: <i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i> (fármacos e produtos de cuidado pessoal)
P-PO ₄	fosfato
PST	do inglês: <i>paralytic shellfish toxin</i> (toxina paralítica de molusco)
PSU	unidade prática de salinidade
PXR	receptor pregnano X
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RA	ácido retinóico
RACE	do inglês: <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RaxML	do inglês: <i>Randomized Axelerated Maximum Likelihood</i> (acelerador randômico de máxima verossimilhança)
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossomal
RNase	enzima que degrada RNA
ROS	do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SC	Scorton Creek, Massachusetts, EUA
SDR	desidrogenase/redutase de cadeia curta
SDR25C2	desidrogenase/redutase de cadeia curta, membro 4
SHRS4	desidrogenase/redutase de cadeia curta, membro 4
SJ	São José, local de coleta

SLC25	proteína mitocondrial carreadoras de soluto
SLC25A38	membro da família SLC25
SOD	superóxido dismutase
SRS	região de reconhecimento de substrato
SSH	hibridação subtrativa supressiva
tBLASTx	busca em um banco de sequências nucleotídicas traduzidas a partir de uma sequência de nucleotídeos traduzida, utilizando o algoritmo BLAST
TCDD	tetraclorodibenzodioxina
TMSB4	timosina beta 4
TOF-MS	Tempo de Vôo - Espectrômetro de Massa
Tris-HCl	tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloro
Tukey HSD	método estatístico utilizado para comparações múltiplas (do inglês: <i>Tukey's Honestly Significant Difference</i>)
VMO - I	proteína da camada externa da membrana vitelínica - I
WAG	modelo de matriz de similaridade de aminoácidos
WHOI	Instituto Oceanográfico de Woods Hole, Massachusetts, USA
XRE	elemento de resposta a xenobióticos
<LDM	abaixo do limite de detecção do método

2. RESUMO

O recente avanço da biologia molecular tem ampliado o conhecimento relacionado a invertebrados marinhos e peixes, gerando inúmeras possibilidades de novas aplicações biotecnológicas. No presente estudo foram identificados e caracterizados novos genes em organismos modelo para estudos ecotoxicológicos.

No capítulo I, foram estudados aspectos moleculares, bioquímicos e químicos, da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*, uma espécie de importância econômica, ecológica e social que ocorre amplamente em estuários e manguezais na costa brasileira, áreas de risco constante de contaminação. Ostras expostas a efluentes contendo esgoto doméstico na Baía Norte da Grande Florianópolis mostraram aumento na atividade da enzima catalase, um biomarcador clássico de contaminação aquática. Bibliotecas subtrativas em ostra, comparando local contaminado e referência, possibilitaram a identificação de 36 novos genes de interesse para estudos ecotoxicológicos em *C. rhizophorae*, alguns deles codificam proteínas possivelmente envolvidas em biotransformação de xenobiótico, metabolismo de lipídeo, defesa imune, estresse oxidativo e ligante de metais.

No capítulo II, bibliotecas públicas de sequências nucleotídicas expressas (ESTs) foram pesquisadas a fim de identificar novos genes de citocromo P450 (CYP) em moluscos bivalves dos gêneros *Mytilus* (mexilhões) e *Crassostrea* (ostras). Um total de 113 sequências CYP foram encontradas, a maioria em *M. californianus* (58). A caracterização preliminar do sistema complemento CYP em *M. californianus*, mostra que assim como é observado em deuterostômios, há uma expansão do Clan 2 neste organismo. Sequências similares as famílias CYP1, CYP3 e CYP26 de vertebrados foram clonadas em *M. edulis*, e a expressão órgão-específica e indução por contaminantes para estes genes foram avaliadas. Os genes *CYP1-like*, similares a CYP1A, que é proposto há décadas como biomarcador para agonistas do receptor AHR em vertebrados, não foi induzida por estas substâncias em *M. edulis*. Interessantemente, genes *CYP3-like* e *CYP26-like* foram induzidos por beta-naftoflavona, o que indica que diferentes mecanismos de ativação gênica, e provavelmente de biotransformação, ocorra nos CYPs em moluscos, quando comparados às famílias CYP similares de vertebrados. Este é o primeiro estudo a mostrar a diversidade do sistema complemento CYP (mesmo

que de forma preliminar); clonar genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like*; e caracterizar a expressão destes genes em um molusco bivalve.

No capítulo III foram identificados três novos genes *CYP1* no peixe-modelo ambiental *Fundulus heteroclitus*. O set completo de genes *CYP1* de peixe (*CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*), mostraram diferentes padrões de distribuição órgão-específica e indução por PCB 126, o que permitiu a escolha das combinações órgão/*CYP1* mais apropriadas para detecção de contaminantes agonistas do receptor AHR. Estudos em uma população de *F. heteroclitus* proveniente de um local historicamente contaminado por PCB mostrou diferenças na expressão de alguns desses novos genes que podem estar relacionadas à adaptação para viver nestes locais. Os genes mais apropriados para detecção de contaminantes agonistas do AHR (*CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1*) também foram clonados no peixe *Poecilia vivipara*, e poderão servir como biomarcadores de contaminação aquática nesta espécie amplamente distribuída em ambientes contaminados da costa Brasileira.

Palavras chave: *Crassostrea*, *Mytilus*, *Fundulus*, *Poecilia*, molusco, bivalves, peixe, CYP1, CYP3, CYP26, citocromo P450, AHR, SSH, poluição, biomarcadores, PCB, ecotoxicologia, esgoto doméstico, expressão gênica.

3. ABSTRACT

Recent advances in molecular biology have accelerated the knowledge regarding marine invertebrates and fish, and provided many possibilities of new biotechnological uses. In the present study, novel genes were identified and characterized in model species for ecotoxicological studies.

In the chapter I, molecular, biochemical and chemical aspects were studied in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*, a bivalve which possesses high economical, ecological and social importance and it is found widely in estuaries and mangroves in the Brazilian coast, areas of constant risk of contamination. Oysters exposed to domestic sewage discharges in the North Bay of Florianópolis showed increased catalase activity, a classical biomarker of aquatic contamination. Subtraction libraries in oyster, comparing contaminated and reference sites, allowed the identification of 36 new genes of interest for ecotoxicological studies in *C. rhizophorae*, some of them codify proteins possibly involved in xenobiotic biotransformation, lipid metabolism, immune defenses, oxidative stress and metal binding.

In the chapter II, public EST libraries were searched for new cytochrome P450 genes in *Mytilus* (mussels) and *Crassostrea* (oysters) bivalve mollusk. A total of 113 CYP sequences were found, most of them in *M. californianus* (58). The preliminary characterization of the CYP complement system in *M. californianus*, showed that as it is observed in deuterostomes, Clan 2 is expanded in this organism. Sequences similar to vertebrate families CYP1, CYP3 and CYP26 were cloned in *M. edulis*, and the organ-specific and the enhanced expression elicited by contaminants of these genes were evaluated. The *CYP1-like* genes, similar to CYP1A that is employed for decades as biomarkers for vertebrates AHR agonist substances, were not induced by those chemicals in *M. edulis*. Interestingly, genes *CYP3-like* and *CYP26-like* were induced by beta-naphthoflavone, indicating that different mechanisms of gene activation, and probably of xenobiotic biotransformation occur for those CYPs in mollusk, comparing to the similar vertebrate CYP families. This is the first study to uncover the CYP complement system diversity (even preliminarily); *CYP1-like*, *CYP3-like* and *CYP26-like* cloning; and gene expression characterization for those new genes in a bivalve mollusk.

In the chapter III, three new *CYP1* genes were identified in the environmental model fish *Fundulus heteroclitus*. The complete set of fish *CYP1* genes (*CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e

CYP1D1) showed different patterns of organ-specific distribution and induction by PCB 126, allowing the selection of the more appropriate organ/*CYP1* combination to detect AHR agonist contaminants. Studies in a *F. heteroclitus* population from a historically PCB contaminated site showed differences in the expression of some of those new genes, which could be involved in the adaptation to live in that site. The genes those were more appropriate for the detection of AHR agonist contaminants (*CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1*) were also cloned in the fish *Poecilia vivipara*, and could be useful biomarkers of aquatic contamination in that species widely distributed in contaminated environmental of the Brazilian coast.

Keywords: *Crassostrea*, *Mytilus*, *Fundulus*, *Poecilia*, mollusk, bivalve, fish, CYP1, CYP3, CYP26, cytochrome P450, AHR, SSH, pollution, biomarkers, PCB, ecotoxicology, domestic sewage, gene expression.

4. INTRODUÇÃO GERAL

4.1. Aplicações biotecnológicas e tóxicológicas no estudo de organismos aquáticos.

Historicamente, a motivação para estudos bioquímicos e fisiológicos com invertebrados aquáticos e peixes se originou em parte pela disponibilidade destes organismos no ambiente e facilidade com que órgãos/tecidos poderiam ser utilizados. Trabalhos bem sucedidos desta natureza levaram a premiação com Nobéis para cientistas que estudaram, por exemplo, larvas e adultos de estrela-do-mar descrevendo processos de fagocitose em imunologia, princípios de propagação de sinal usando axônios gigantes de lula, identificação de genes que controlam o desenvolvimento em drosófila e peixe-zebra, identificação de uma enzima que trabalha com ATPase na regulação celular dos níveis de potássio e sódio em nervos das patas de carangueijos ou glândula retal de tubarão e bases celulares de memória e aprendizado usando aplísias (molusco, gatropoda) (HINTON et al., 2009).

O estudo toxicológico em peixes foi revisado recentemente (HAHN; HESTERMANN, 2008) e segundo estes autores, dois fundamentos principais nestes estudos podem ser apontados: (1) Peixes como alvo (2) Peixes como modelo para estudos mecanísticos (HINTON et al., 2009).

O primeiro fundamento vem sendo freqüentemente utilizado na ecotoxicologia aquática. Isto porque o meio aquático não é um ambiente homogêneo e, portanto, existem variações na biodisponibilidade de substâncias para os organismos. Os próprios organismos possuem aspectos particulares em relação a toxicocinética de substâncias liberadas no ambiente aquático (ex.: absorção, metabolismo, bioconcentração, eliminação). Por esta razão, análises de biomarcadores de contaminação aquática e análise de bioensaios vêm sendo estudadas em peixes para uma possível utilização na análise de risco de substâncias liberadas no ambiente aquático (HINTON et al., 2009).

O segundo fundamento é mais recente, e se refere às relações evolutivas entre peixe e humanos, para estudo de mecanismos de toxicidade e de doenças. O estudo mais detalhado de tais relações foi facilitado pela análise dos genomas destes organismos. As vantagens do uso de peixes para estudos mecanísticos incluem pequeno tamanho, desenvolvimento rápido, tempo de gerações curto, desenvolvimento embrionário externo que facilitam os estudos de toxicologia do desenvolvimento e avaliação de misturas complexas de contaminantes. Espécies transgênicas e

knockdown de genes são técnicas promissoras para estudos mecanísticos utilizando estes organismos. Estes e outros aspectos na utilização de peixes como modelos em estudos toxicológicos são descritos em peixe-zebra (*Danio rerio*), killifish (*Fundulus heteroclitus*), medaka (*Oryzias latipes*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (HINTON et al., 2009).

O estudo de invertebrados aquáticos ao nível genômico tem gerado uma série de possibilidades de aplicação no campo de biotecnologia. Os oceanos ocupam aproximadamente 70% da superfície da Terra e possuem uma diversidade extraordinária de organismos. O interesse nos ecossistemas aquáticos tem sido acelerado nos últimos anos pelo reconhecimento crescente da importância dos organismos que o habitam. Portanto, a biologia marinha vem se tornando uma área emergente no campo das ciências biológicas (THAKUR et al., 2008). A biologia marinha é uma ciência interdisciplinar que une os campos de oceanografia biológica, fisiologia, biologia celular e biologia molecular para o estudo da vida nos oceanos, estuários e ilhas e tem revelado novas descobertas científicas e oportunidades econômicas. O advento da biologia molecular tem tido uma grande influência nos estudos de ecossistemas marinhos, e várias aplicações vem sendo apontadas no uso de técnicas moleculares. Dentre estas, pode-se citar aplicações nos campos de microbiologia marinha, biologia de invertebrados marinhos, ecologia marinha, identificação de produtos naturais marinhos, novos materiais, pesca, conservação e bio-invasão, biorremediação e toxicologia aquática (THAKUR et al., 2008).

Neste sentido, moluscos bivalves vêm sendo estudados ao nível gênico, principalmente pela geração de bibliotecas de sequências expressas (ESTs) e identificação de sequências de DNA microssatélites. A natureza destes experimentos reflete os interesses em diferentes campos da ciência aplicada. Por exemplo, genes que codificam as proteínas do bisso e formação das valvas têm sido estudados com potencial para utilização na indústria de materiais; genes relacionados a imunidade e resistência a doenças pelo seu interesse em aquicultura; genes relacionados a respostas ao estresse e contaminantes para utilização no monitoramento ambiental; estudo de processos metabólicos como respiração, metabolismo do cálcio, digestão, desenvolvimento, contração muscular, *turnover* de proteínas, atividade neuronal e reprodução para estudo de processos celulares; genes ribossomais e

microsatélites no DNA para estudos filogenéticos e de genética populacional nestes organismos (SAAVEDRA; BACHERE, 2006).

Apesar do estudo em moluscos bivalves ter importância reconhecida, a compreensão de mecanismos básicos de toxicidade nestes organismos ainda não é muito clara. Assim, a utilização de modelos vertebrados para guiar o estudo em invertebrados é quase sempre necessária, mas geralmente mostra-se inadequada tendo em vista a grande distância filogenética que separa estes grupos. Em alguns casos, a pesquisa em invertebrados produziu resultados promissores, quando determinados mecanismos foram estudados em detalhes, tais como os mecanismos de resistência em uma população do molusco de areia *Mya arenaria* para uma toxina produzida por *bloom* de microalgas (PST, *paralytic shellfish toxin*). Um estudo publicado na revista *Nature* mostrou que certas populações de *Mya arenaria* (bivalve) que convivem com estas toxinas no ambiente, sem serem afetadas pelas mesmas, possuem uma mutação nucleotídica única que causa uma substituição de aminoácido no canal de membrana de Na^+ , o qual é o alvo de ligação para a toxina PST (BRICELJ et al., 2005). Apesar deste mecanismo de resistência aos efeitos da PST ter sido compreendido nesta população de bivalve, os mecanismos de biotransformação e depuração destas toxinas ainda não estão elucidados em detalhes. A adoção de moluscos bivalves como modelos para estudos mecanísticos de toxicologia poderão ter aplicabilidade em várias áreas biotecnológicas, como por exemplo, para o monitoramento ambiental e aquicultura (SAAVEDRA; BACHERE, 2006).

4.2. A poluição marinha

A poluição marinha é definida como a introdução pelo homem, na forma direta ou indireta, de substâncias ou de energia em um ambiente marinho, incluindo estuários, resultando em um efeito deletério para os recursos vivos e danos para a saúde humana (GESAMP, 1991).

Estas substâncias são denominadas contaminantes ou poluentes, sendo que o termo poluente se distingue do primeiro por indicar efeitos biológicos adversos em organismos (WALKER et al., 1996). Tais substâncias, ainda podem ser denominadas xenobióticos, referindo-se a moléculas que não fazem parte da bioquímica usual de um organismo (WALKER et al., 1996). Os contaminantes xenobióticos estão em constante aumento no ambiente, tanto em sua quantidade, quanto em sua

variedade (LIVINGSTONE, 1993), e afetam ecossistemas da costa brasileira tais como manguezais, restingas, estuários, recifes de corais, dentre outros (MMA, 1996).

Dentre os ecossistemas historicamente impactados pela ação antrópica, estão os estuários, uma vez que muitos centros urbanos e industriais se localizam entorno destes ecossistemas costeiros (KENNISH, 1991). Segundo órgãos ambientais americanos, 7,5% dos estuários da costa deste país estão acima dos limites de poluição, levando em conta análises químicas no sedimento e testes de toxicidade em organismos aquáticos (BOESCH et al., 2001). A introdução de contaminantes de origem antrópica em estuários ocorre por diversas vias, tais como esgotos, despejos de barcos, rios, deposição atmosférica e fontes não específicas de escoamento proveniente da terra (KENNISH, 1991). Dentre os principais contaminantes estão metais pesados, compostos orgânicos sintéticos e não sintéticos, cargas elevadas de nutrientes e patógenos (KENNISH, 1991). Florações de cianobactérias também podem representar uma importante fonte de contaminação por toxinas (MINILLO; FERREIRA; YUNES, 2000). Essas florações podem ser favorecidas em ambientes em eutrofização, pelo enriquecimento das águas por nutrientes como amônia, nitrato e silicato (BAUMGARTEN; NIENCHESKI; KUROSHIMA, 1995).

O esgoto doméstico é uma das principais fontes de contaminação na costa Brasileira, tendo em vista que uma pequena porção da população é atendida com sistemas de coleta e tratamento destes efluentes (II Workshop Regional Sul Sobre o Mar, 1998). Desastres ambientais, muitas vezes relacionados à extração e transporte de substâncias, com significativo dano para a biota e para as populações humanas que dependem dela também são freqüentes no Brasil e no mundo. Dentre os inúmeros desastres ecológicos causados por derrames estão aqueles ocorridos em 2004 no Porto de Paranaguá; em 2002, na Península Valdez – Espanha (CAVALLARI, 2002); em 2001, o vazamento de 1,3 milhão de litros de óleo na Baía de Guanabara de um oleoduto da Petrobrás; e em 1998, o acidente com um navio que carregava 12.000 toneladas de ácido sulfúrico concentrado no Estuário da Lagoa dos Patos (MIRLEAN et al., 2001).

Assim, o aumento no grau, variedade e complexidade dos problemas causados pelo uso das zonas costeiras nas últimas décadas, têm gerado a necessidade de proteger seus recursos e avaliar as condições de seus sistemas físicos, químicos e biológicos (KENNISH, 1991).

4.3. O uso de organismos aquáticos no monitoramento ambiental

Tendo em vista os impactos causados pelas atividades antrópicas no ambiente aquático, mostra-se necessária a criação de programas multidisciplinares de monitoramento (RAND et al., 1995). A fim de monitorar a contaminação nos ecossistemas e os efeitos dos contaminantes nos organismos e nas populações biológicas, estudos têm utilizado organismos-modelo com diferentes propósitos. Tais espécies têm sido definidas, segundo sua utilização, como indicadores, sentinelas ou monitoras (BEEBY, 2001).

As espécies indicadoras acusam mudanças nas estruturas populacionais (abundância ou ausência de determinadas espécies) causadas pelo impacto antrópico. O termo sentinela refere-se a organismos que são utilizados no monitoramento para análises químicas, no intuito de refletirem as concentrações de contaminantes biodisponíveis no ambiente. O termo monitor, refere-se a organismos que são utilizados no monitoramento por indicarem algum efeito adverso nas suas funções ou performance, tais como em parâmetros fisiológicos, histológicos e bioquímicos, quando expostos a contaminantes no ambiente (BEEBY, 2001).

Programas de monitoramento do ambiente aquático vêm utilizando frequentemente peixes e bivalves como organismos biomonitores (CAJARAVILLE et al., 2000). Os moluscos bivalves (ex.: mexilhões e ostras) apresentam várias características biológicas e ecológicas que representam vantagens para sua utilização neste tipo de estudo (CHEUNG et al., 2001; NIYOGI et al., 2001; REGOLI et al., 2002; MORILLO; USERO; GRACIA, 2004.). Por outro lado, o uso de peixes em estudos ambientais tem como principal vantagem, se comparados aos moluscos, um amplo conhecimento acumulado na literatura e maior semelhança bioquímica e molecular com vertebrados extensivamente estudados (ex.: camundongo e ser humano). Além disso, várias espécies de peixes possuem o seu genoma completo sequenciado e caracterizado, por exemplo, *Tetraodon nigroviridis*, *Gasterosteus aculeatus*, *Oryzia latipes*, *Danio rerio* e *Takifugu rubripes* (HAN; ZHAO, 2008), o que facilita a realização de estudos de expressão gênica nestes organismos e, portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade causada pelos contaminantes. A espécie

Danio rerio (peixe-zebra), por exemplo, tem sido usada há muitos anos como um sistema modelo para o estudo de toxicologia (LEE; KRONE, 1996). A caracterização detalhada de alguns mecanismos de indução gênica por baixos níveis de contaminantes específicos, também justifica a utilização de peixes no monitoramento ambiental. Por exemplo, o mecanismo de indução de genes da família 1 de citocromo P450 (*CYP1*) via ativação do receptor de hidrocarboneto (AHR) é bem conhecido em peixes modelo para estudos ambientais (ex.: *Fundulus heteroclitus*; ZANETTE et al., 2009) e bem caracterizada na literatura (JONSSON et al., 2007 a b), porém desconhecido em moluscos (REWITZ et al., 2006).

Em suma, moluscos bivalves e peixes, apresentam características que tornam estes organismos importantes modelos para estudos toxicológicos no ambiente aquático.

4.4. Os biomarcadores de contaminação aquática

Os biomarcadores são definidos por Walker et al. (1996) como alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos poluentes. Dentre esses, os biomarcadores moleculares ou bioquímicos apresentam a vantagem de servirem como sinais de aviso prévio da degradação ambiental causada por contaminantes (RAND et al., 1995), antecipando assim possíveis danos em maior escala, tais como efeitos deletérios nas populações e comunidades biológicas (ADAMS et al., 1989; CAJARAVILLE et al., 2000). Além disso, a análise destes biomarcadores apresenta na maioria dos casos, menor custo, maior facilidade e rapidez do que as análises químicas convencionais (GALLOWAY et al., 2004). Apesar destas vantagens, a especificidade das respostas dos biomarcadores para as diferentes classes de contaminantes na maioria das vezes não é muito clara. Desta forma, os programas de monitoramento vêm utilizando esta ferramenta com cautela e de maneira programada e esquemática juntamente com as análises químicas (GALLOWAY et al., 2004).

Os biomarcadores podem indicar tanto a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição), como a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000). Dentre os biomarcadores de exposição, estão as enzimas de biotransformação de xenobióticos, as metalotioneínas e as defesas antioxidantes

(enzimáticas e não enzimáticas), sendo que dentre os biomarcadores de efeito estão os níveis de dano no DNA e de oxidação de lipídios e proteínas (RAND et al., 1995; CAJARAVILLE et al., 2000).

Muitos contaminantes orgânicos são lipofílicos, o que faz com que sejam rapidamente absorvidos pelos organismos aquáticos, através das membranas lipídicas das brânquias, pele e trato digestivo. Após a absorção, a ação destes compostos vai depender de sua susceptibilidade à biotransformação. Compostos que não são biotransformados tendem a ser acumulados no tecido adiposo. Aqueles que são biotransformados deverão ser convertidos a um metabólito mais hidrossolúvel que o parental, facilitando assim o processo de eliminação. Apesar disso, alguns contaminantes orgânicos ao serem biotransformados tornam-se mais tóxicos que os parentais (ex.: metanol, anilina, naftaleno e paration) (RAND, 1995).

Uma variedade de enzimas e proteínas, tais como o complexo citocromo P450 (CYP), as flavina-monooxigenases (FMOs), as monoamina-oxidases (MAO), as glutationa *S*-transferases (GSTs), entre outras, estão envolvidas em processos de biotransformação de xenobióticos, dentre os quais estão duas fases principais. A fase-I de biotransformação é realizada pelas monooxigenases microsossomais como o citocromo P450 e as flavina-monooxigenases (FMOs). As enzimas da fase-II catalisam a conjugação dos xenobióticos (biotransformados pela fase-I ou não) com moléculas endógenas, tornando-as mais solúveis. As glutationas *S*-transferases (GSTs) são descritas como as principais enzimas de biotransformação de fase-II e representam uma família de enzimas relacionadas com a conjugação de uma variedade de metabólitos eletrofílicos endógenos e exógenos (xenobióticos) com o tripeptídeo glutationa (GSH). Recentemente, uma fase-III de biotransformação de xenobióticos foi caracterizada por apresentar uma resistência multixenobiótica (MXR). Esta fase é realizada por proteínas de membrana que expulsam os xenobióticos da célula (KEPPLER; RINGWOOD, 2001).

As defesas antioxidantes estão presentes em todos os organismos aeróbicos, uma vez que intermediários reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), são produzidos no processo de fosforilação oxidativa para obtenção de energia, ação fagocitária de leucócitos, atividade de enzimas como a xantina oxidase, triptofano dioxigenase, diamina oxidase, prostanglandina sintetase, entre outras (DI GIULIO et al., 1989; STOREY, 1996). A formação de ROS pode ser aumentada pela presença de certas classes de xenobióticos. A biotransformação de quinonas,

antraciclina, paraquat, bleomicina, compostos aromáticos nitrogenados, entre outros, por enzimas de biotransformação de fase-I (ex.: complexo citocromo P450), resulta na formação do radical O_2^- (Kappus, 1986; DI GIULIO et al., 1989). Além disso, metais de transição como o Cu, também podem produzir estas espécies reativas de oxigênio ao participarem diretamente do ciclo redox, doando um elétron para o O_2 (WINSTON; DIGIULIO, 1991).

Em ambientes poluídos pode ocorrer o aumento na produção de ROS, e neste caso, os organismos necessitam aumentar suas defesas antioxidantes a fim de evitar os efeitos nocivos causados por estas espécies químicas. Desta forma, o aumento nas defesas antioxidantes enzimáticas, tais como as atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) que degradam o H_2O_2 em H_2O , e da enzima superóxido dismutase (SOD) que inativa o O_2^- gerando H_2O_2 , são utilizados como biomarcadores de exposição em ambientes contaminados. Além das defesas enzimáticas, também existem antioxidantes não-enzimáticos, tais como as vitaminas E, vitamina C, ácido úrico, beta-caroteno e a glutathione reduzida (GSH), que auxiliam nas defesas antioxidantes, interrompendo a cadeia de reações autocatalíticas causadas pelos radicais livres (STOREY, 1996). O desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes nas células, causado pela poluição, pode levar a uma situação de estresse oxidativo nos organismos, ocasionando processos mutagênicos e carcinogênicos (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992). Além de danos no material genético, um dos maiores contribuintes para a perda de função celular em uma situação de estresse oxidativo é a peroxidação de lipídios de membranas pelas ROS (HERMES-LIMA, 1995).

Além dos contaminantes citados acima, os metais são potenciais causadores de estresse oxidativo, uma vez que causam tanto diminuição das concentrações de GSH, como peroxidação de lipídios (ROMEIO; BARELLI, 1997; CONNERS; RINGWOOD, 2000). A diminuição no *pool* de GSH torna os organismos mais susceptíveis ao estresse oxidativo (CONNERS; RINGWOOD, 2000). As toxinas produzidas pelos *blooms* de microalgas (ex.: microcistinas), também já foram relatadas como causadoras de depleção do *pool* de GSH, uma vez que durante a biotransformação no organismo são conjugadas com as moléculas de GSH (PFLUGMACHER et al., 1998).

O uso de biomarcadores bioquímicos de contaminação para a avaliação ambiental tem sido incorporado em vários programas de monitoramento na Europa e Estados Unidos e avaliados por uma

série de *workshops* organizados pelo ICES (Conselho Internacional para Exploração do Mar) e IOC (Comissão Oceanográfica Intergovernamental) (CAJARAVILLE et al., 2000). Na região costeira do Brasil, podem ser citados o projeto MOMAM (Monitoramento do Ambiente Marinho) estabelecido em 1997 e coordenado pelo Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM – Ministério da Marinha) (VENTURA et al., 2004) e o projeto RECOS-QIABO (Recursos Costeiros – Qualidade Ambiental; Institutos do Milênio, Ministério da Ciência e Tecnologia) (ZANETTE et al., 2006).

4.5. A biologia molecular como ferramenta na identificação de novos biomarcadores

Os biomarcadores moleculares, baseados principalmente no estudo da expressão de genes relacionados com determinadas respostas bioquímicas e celulares após exposição a contaminantes, vêm recebendo especial atenção nos últimos anos. Algumas técnicas moleculares têm possibilitado a avaliação da expressão de um grande número de genes simultaneamente. Tais técnicas auxiliam na compreensão das respostas genômicas globais de um organismo frente a uma substância ou condição e tem o potencial de identificar novos biomarcadores ainda desconhecidos (BULTELLE et al., 2002). No esforço de interpretar tais resultados foi caracterizado um novo campo da ciência denominado toxicogenômica (KOSKINEN et al., 2004).

De maneira geral, as técnicas que avaliam a expressão de múltiplos genes podem ser divididas em duas grandes famílias de tecnologias: sistemas fechados e abertos (BULTELLE et al., 2002). Para a utilização de sistemas fechados é necessário que haja uma caracterização prévia dos genes da espécie em questão, obtidos a partir do genoma da espécie, bibliotecas de sequências expressas (ESTs), dentre outras. Dentre as técnicas de sistema fechado mais comuns estão as de hibridização cruzada através de *arrays* utilizando oligonucleotídeos ou cDNA (DNA complementar) (ex.: *microarray*) (BULTELLE et al., 2002). Por outro lado, as técnicas de sistema aberto, como por exemplo, a técnica de hibridação subtrativa supressiva (SSH), dispensa a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie em questão, o que se apresenta como uma vantagem para o estudo com organismos cujo genoma ainda é pouco caracterizado, como é o caso da grande maioria das espécies de organismos vivos até então.

Uma vez identificados, a expressão dos genes biomarcadores também podem ser avaliada quantitativamente por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos.

No presente estudo, foram utilizadas técnicas de biologia molecular para a identificação e caracterização da expressão de genes potencialmente úteis em estudos ecotoxicológicos utilizando-se moluscos bivalves (*Mytilus edulis* e *Crassostrea rhizophorae*) e peixe (*Fundulus heteroclitus* e *Poecilia vivipara*). Os resultados apontam para importantes particularidades em relação aos novos genes identificados nestes organismos, em relação a sua distribuição órgão-específica, e de regulação da expressão em resposta a contaminantes.

5. OBJETIVOS GERAIS

- Verificar possíveis alterações bioquímicas e moleculares na ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* expostas *in situ* em uma região contaminada por esgoto doméstico e identificar um conjunto de novos genes nesta espécie para utilização em futuros estudos ambientais e toxicológicos.
- Identificar genes do sistema citocromo P450 (CYP) de moluscos bivalves (ostras e mexilhões) e caracterizar, a nível filogenético e de expressão, novos genes identificados das famílias CYP1, CYP3 e CYP26 no mexilhão *Mytilus edulis*.
- Identificar novos genes de citocromo P450 da família 1 (CYP1) em peixes modelo para estudos ambientais e caracterizar aspectos filogenéticos, de expressão gênica e diferenças populacionais relacionadas a contaminação por um agonista do receptor AHR no peixe *F. heteroclitus*.

6. CAPÍTULO I

**Alterações bioquímicas e moleculares em ostra-do-mangue
Crassostrea rhizophorae expostas a uma região contaminada por
esgoto doméstico**

6.1. INTRODUÇÃO

6.1.1. Características da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828)

A sistemática da ostra *C. rhizophorae* está relacionada abaixo:

Superfilo	Lofotrocozoa
Filo	Mollusca
Classe	Bivalvia
Subclasse	Pteriormorphia
Ordem	Ostreoida
Família	Ostreidae
Gênero	Crassostrea
Espécie	<i>Crassostrea rhizophorae</i>



Figura 1. Ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*.

A ostra *Crassostrea rhizophorae* (Figura 1) é conhecida popularmente como ostra-do-mangue, gururi ou ostra-gaiteira, possui hábito alimentar filtrador, crescimento máximo de aproximadamente 120 mm, e é encontrada tipicamente nas raízes de *Rhizophora mangle* (mangue vermelho) e *Laguncularia racemosa* (mangue branco) ou presos a rochas (NASCIMENTO; PEREIRA; COSTAESOUZA, 1980). A ostra-do-mangue é considerada uma espécie de importância econômica para populações da costa Atlântica da América do Sul (CARRANZA; DEFFEO; BECK, 2009), frequentemente encontrada em locais potencialmente poluídos como estuários, mangues e baías da costa brasileira e apresenta uma distribuição geográfica que se estende desde o Sul do Brasil até o Caribe (BOFFI, 1979; CARRANZA; DEFFEO; BECK, 2009). Diferentes estudos têm dado ênfase para a utilização desta espécie no monitoramento ambiental (NASCIMENTO et al., 1998; WALLNER-KERSANACH et al., 2000; REBELO; DO AMARAL; PFEIFFER, 2003; SILVA; RAINBOW; SMITH, 2003; DA SILVA et al., 2005). Apesar da classificação morfológica de espécies

de ostras do gênero *Crassostrea* ser considerada complicada, o que poderia representar um entrave no uso de *C. rhizophorae* como espécie modelo para estudos ambientais, estudos recentes estabelecem que as duas principais espécies nativas da costa brasileira (*C. rhizophorae* e *C. brasiliana*) e uma espécie exótica (*C. gigas*) podem ser facilmente diferenciadas por metodologias moleculares, como por exemplo, por PCR-RFLP (PIE et al., 2006; CARRANZA; DEFFEO; BECK, 2009).

6.1.2. A problemática do esgoto doméstico

O despejo de esgoto doméstico é uma das principais fontes de contaminação nos ecossistemas marinhos e estuarinos (ABESSA et al., 2005; MEDEIROS, 2008; MARTINS et al., 2008). No Brasil, estima-se que somente 20% da população esteja conectadas a um sistema de coleta e tratamento de esgoto (II Workshop Regional Sul Sobre o Mar, 1998). Considerando que algumas áreas potencialmente contaminadas da costa brasileira e particularmente no Estado de Santa Catarina estão associadas a zonas de mitilicultura, ostreicultura, pesca, recreação e abastecimento, o monitoramento da contaminação destas regiões requer uma atenção especial.

A determinação da variedade e concentração das substâncias presentes em efluentes urbanos, assim como seu risco para a biota, é bastante complexa e difícil de ser determinada. Em geral, a composição de efluentes tratados ou não está relacionada a vários fatores como, por exemplo, o tipo de uso da água e o grau de desenvolvimento social da região. Portanto a composição do esgoto é incerta e pode variar de acordo com as atividades humanas (ABESSA et al., 2005). Estes efluentes podem conter matéria orgânica e contaminantes, tais como produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza, etc. (ABESSA et al., 2005). A contaminação dos ecossistemas costeiros por esgoto é uma preocupação mundial, uma vez que cidades que não possuem coleta, tratamento e despejos adequados para o esgoto, apresentam um maior risco de contaminação microbiológica e química (MEDEIROS, 2008).

O esgoto despejado na costa brasileira geralmente tem uma composição típica, com altos níveis de sólidos e nutrientes e baixa concentração de metais, hidrocarbonetos e pesticidas. Em alguns casos, o esgoto urbano ainda pode apresentar uma mistura de efluentes domésticos, hospitalares, de postos de combustíveis e de pequenas indústrias (ABESSA et al., 2005). O esgoto doméstico ainda pode apresentar substâncias que vêm sendo consideradas “contaminantes emergentes”, característicos

de efluentes municipais. Dentre estas, estão fármacos, produtos de uso pessoal (PPCPs) e desreguladores endócrinos (EDCs) que apenas recentemente vem recebendo atenção quanto aos efeitos para a biota e regulamentação para o descarte no ambiente (BOLONG et al., 2009).

6.1.3. Uso de bivalves em estudos ecotoxicológicos

Historicamente, o uso de bivalves para análises químicas precedem sua utilização para avaliação de alterações biológicas em estudos ambientais. Análises químicas nestes organismos são utilizadas há mais de cinquenta anos para detecção da presença e concentração de contaminantes orgânicos no ambiente aquático (CAHNMANN; KURATSUNE, 1957 *apud* STEGEMAN et al., 1973). Os fatos de serem cosmopolitas, sésseis, abundantes, filtradores e acumularem contaminantes contribuíram para o interesse no uso destes organismos como sentinelas ambientais em programas de monitoramento da poluição costeira, a exemplo do pioneiro *Mussel Watch* realizado na costa dos EUA e em outras regiões do mundo (KRISTNER, 1984; JENERLOV, 1996). A partir da década de 80, o estudo das respostas bioquímicas nestes organismos mostrou-se também uma prioridade em programas de avaliação da qualidade ambiental com o objetivo de detectar efeitos adversos e os mecanismos pelos quais os organismos podem sobreviver e se adaptar a um novo ambiente (LIVINGSTONE, 1984) e são amplamente utilizados em programas de monitoramento da qualidade ambiental (ex.: CAJARAVILLE et al., 2000; BEBIANO et al., 2007; GORBI et al., 2008).

Alguns autores apontam os biomarcadores bioquímicos em bivalves, como potenciais ferramentas para a avaliação de risco ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000; BEBIANO et al., 2007; HAGGER et al., 2008). Porém, apesar do esforço da comunidade científica para identificar e validar seu uso, as respostas bioquímicas analisadas em bivalves tem sido utilizadas apenas como ferramentas complementares na avaliação de risco. Alguns projetos (ex.: projeto ECOMAN) sugerem a necessidade de um ponto de vista holístico ao invés de pontual para o seu uso (GALLOWAY et al., 2004). Problemas na utilização de biomarcadores em bivalves tem sido discutidos há mais de duas décadas, e de acordo com Livingstone (1984) se encaixam em duas categorias, (1) considerações práticas da detecção de mudanças bioquímicas ou diferenças contra uma variabilidade basal acentuada nestes organismos e (2) interpretação da significância de tal diferença observada.

Aparentemente, as dificuldades no uso de biomarcadores apontados por Livingstone em 1984 persistem até os dias atuais (ex.: RICKWOOD; GALLOWAY, 2004; GORBI et al., 2008). Por exemplo, Rickwood et al. (2004) ao avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), um biomarcador classicamente utilizado em vertebrados para análise de risco para exposição a pesticidas, verificou ausência de inibição na atividade desta enzima em mexilhões expostos a concentrações ambientalmente relevantes de um pesticida organofosforado. Apesar da ausência de inibição da enzima *in vivo* no estudo de Rickwood et al. (2004), foram observados efeitos fisiológicos (ex.: controle neuromuscular) e imunológicos (ex.: habilidade fagocítica) similares aos sintomas característicos observados em mamíferos. Além disso, a avaliação da atividade da enzima do mesmo animal mostrou-se altamente sensível a inibição *in vitro* pelo contaminante. O autor aponta a falta de conhecimento a respeito do metabolismo e mecanismos de toxicidade de organofosforados em bivalves, como a principal causa para a dificuldade na interpretação dos resultados obtidos com biomarcadores enzimáticos e sua possível aplicação. No mesmo sentido, Saavedra e Bachere (2006) também discutem a carência de informações a respeito dos mecanismos moleculares e celulares relacionados aos processos básicos de reprodução, nutrição e detoxificação em moluscos bivalves.

Com os avanços da biologia molecular e crescente aumento no número de bibliotecas de sequências expressas (ESTs) em certas espécies de moluscos bivalves, têm gerado ferramentas promissoras para o estudo de mecanismos bioquímicos e moleculares. Em novembro de 2006, o Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (NCBI, GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), disponibilizava 13.722 ESTs de Ostreidea e 7.281 de Mytilidae (Tanguy et al., 2008). Atualmente, o mesmo centro de informação disponibiliza 56.999 ESTs para o gênero *Mytilus* (42.354 para *M. californianus* e 14.645 para *M. edulis*) e 44.133 para o gênero *Crassostrea* (29.573 para *C. gigas* e 14.560 para *C. virginica*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (pesquisa realizada em junho de 2009). Uma grande parte destas ESTs ainda não possui anotação, o que significa que sua homologia com genes de função conhecida em vertebrados/invertebrados permanece para ser elucidada e a regulação da expressão destes genes ainda permanece por ser caracterizada. Por exemplo, o presente trabalho (vide capítulo 2) realizou uma pesquisa preliminar no banco de ESTs de *M. californianus* e encontrou aproximadamente 60 sequências homólogas a CYPs, algumas delas

pertencentes às famílias 1, 2 e 3, classicamente induzíveis e associadas ao metabolismo de contaminantes orgânicos e drogas no ser humano (NEBERT; RUSSEL, 2002). Tal constatação possibilitou um avanço na caracterização da indução destes genes por contaminantes, uma vez que, a partir disso, iniciadores específicos foram utilizadas na avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

No presente capítulo, foi realizado um estudo de avaliação dos efeitos em ostras-do-mangue *C. rhizophorae* expostas a um gradiente de contaminação por esgoto doméstico utilizando-se análises microbiológicas, hidroquímicas, assim como análises químicas de várias classes de contaminantes (orgânicos e metais). Esta região foi utilizada como “modelo” para um estudo *in situ* onde foi avaliado o efeito de esgoto doméstico não tratado em biomarcadores bioquímicos e moleculares em *C. rhizophorae*. Além disso, um conjunto de genes com potencial para utilização em estudos ecotoxicológicos foi identificado nesta espécie, que apesar de ter uma importância social e econômica reconhecida, ainda carece de informações biológicas ao nível gênico.

6.2. OBJETIVOS

- Estabelecer uma região costeira “modelo” para avaliação *in situ* dos efeitos do esgoto doméstico não-tratado em ostras-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*;
- Avaliar a presença e concentração de diferentes classes de contaminantes em ostras transplantadas para a região de estudo e expostas por um período de duas semanas;
- Detectar possíveis respostas de biomarcadores bioquímicos nas ostras após a exposição aos efluentes contaminados por esgoto doméstico em um estudo de campo;
- Identificar novos genes em *C. rhizophorae* possivelmente induzidos pela exposição ao esgoto doméstico utilizando diferentes técnicas moleculares;
- Avaliar a expressão quantitativa de alguns genes em ostras *C. rhizophorae* mantidas na região de estudo.

6.3. MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1. Experimento em campo

As ostras *C. rhizophorae* utilizadas neste estudo, foram obtidas na estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM, CCA, UFSC) localizado na Praia de Sambaqui (Florianópolis, SC) e imediatamente transportadas para uma região costeira no município de São José para realização dos experimentos de exposição *in situ* a esgoto doméstico. A escolha desta região para o estudo de exposição foi baseada em uma investigação prévia dos principais locais de lançamento de esgoto não tratado em baías do município de São José, pelo Projeto Baía-Limpa do CEMEA (Centro Municipal de Educação Ambiental – Escola do Mar). Tal monitoramento prévio incluiu análises quinzenais de coliformes fecais e totais por um período de um ano e demonstrou a possibilidade de utilização de locais altamente contaminados por esgoto doméstico e de outros com características físicas e químicas similares (ex.: salinidade, temperatura, pH), porém com pouca ou nenhuma contaminação aparente (NUNES, 2008).

A foz do Rio Bücheler (27°34'22,98" S; 48°35'58,59") foi escolhida como local contaminado para exposição das ostras (SJ1; Figura 2). Este rio possui uma largura de aproximadamente 5 m, extensão de 1800 metros e drena uma pequena bacia hidrográfica altamente urbanizada (NUNES, 2008) (Figura 2). O local escolhido como referência se situa nas proximidades da Pedra das Tipitingas (27°31'31,77"S; 48°36'23,00"O), distante cerca de 5.500 metros do local contaminado e cerca de 2.200 metros da costa (SJ4; Figura 2).

Dois experimentos de exposição foram realizados para avaliação de respostas bioquímicas e moleculares das ostras *in situ*. Ambos experimentos utilizaram a mesma população de ostras, provenientes do cultivo do LMM (Laboratório de Moluscos Marinhos, CCA, UFSC) localizado na praia de Sambaqui. No experimento I, realizado entre os dias 31 de agosto e 14 de setembro de 2006, ostras (2,5 a 3,5 cm) foram transplantadas do LMM para mini-balsas contendo gaiolas flutuantes com aproximadamente 40 ostras submersas a 10 cm da superfície. As mini-balsas foram posicionadas com o auxílio de um GPS, nas distâncias de 10 m (SJ1), 500m (SJ2), 1.500m (SJ3) e 5.500m (SJ4) em relação à desembocadura do Rio Bücheler (contaminado) (Figura 2), onde permaneceram por 14 dias

antes de serem coletadas. No experimento II, realizado entre os dias 9 e 23 de março de 2007, minibalsas contendo as ostras (4 a 7 cm) foram posicionadas a 10 m da foz do Rio Bücheler (SJ1; contaminado) ou a 5.500 m do mesmo rio (Pedra das Tipitingas) (SJ4; referência), onde permaneceram por períodos de 24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas, antes da coleta dos animais. Em suma, o experimento I foi desenhado no intuito de gerar informações para a identificação de um gradiente de contaminação por esgoto doméstico e avaliar as respostas das ostras para este gradiente. No experimento II, ostras foram expostas a apenas dois locais (SJ1 e SJ4) por diferentes tempos de exposição (24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas) a fim de se verificar a variação temporal nas respostas das ostras expostas aos contaminantes. Nos dois experimentos, parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água foram monitorados periodicamente durante a exposição das ostras *in situ*.

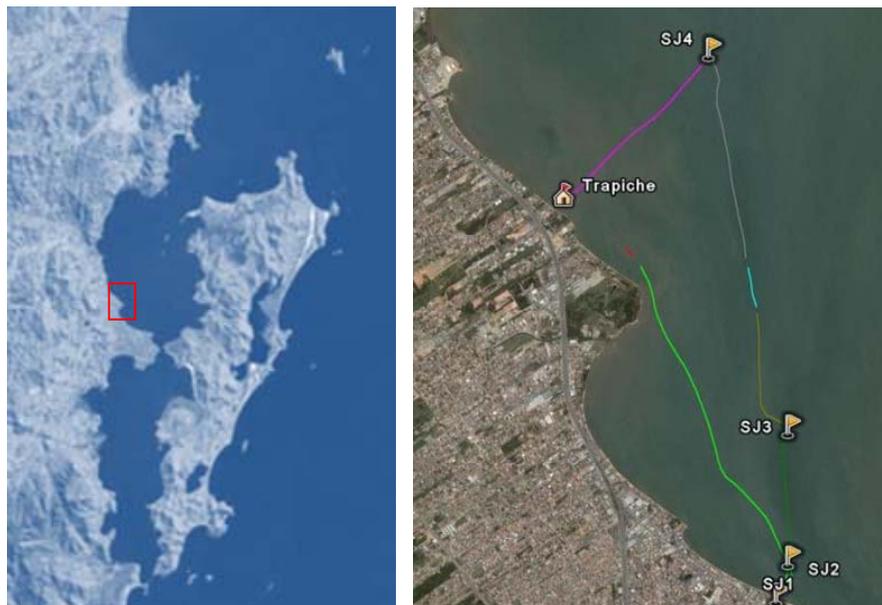


Figura 2. Localização dos pontos de exposição das ostras *C. rhizophorae* na Baía Norte da região da Grande Florianópolis, SC, Brasil. SJ1 indica o ponto mais contaminado, localizado na foz do Rio Bucheler ($27^{\circ}34'22,98''$ S; $48^{\circ}35'58,59''$). SJ4 indica o local mais afastado da foz do Rio Bucheler (referência) localizado próximo a Pedras das Tipitingas ($27^{\circ}31'31,77''$ S; $48^{\circ}36'23,00''$).

Tanto no Experimento I, como no Experimento II, amostras de glândula digestiva e brânquias foram dissecadas no momento da coleta das ostras, imediatamente congeladas em N_2 líquido e conservadas em freezer $-80^{\circ}C$ para posterior realização das análises bioquímicas ($n=7$ amostras) e de expressão gênica ($n=7$ amostras) em cada grupo de animais. No experimento I, excepcionalmente, foi feito um pool do órgão (brânquia ou glândula digestiva) de duas ostras para cada amostra (tanto

amostra bioquímica quanto molecular), devido ao tamanho pequeno dos animais. No experimento II, cada amostra coletada representa um indivíduo. Após duas semanas de exposição, um pool de 10 ostras mantidas em cada local foi coletado para a realização da análise de metais, assim como um pool de 10 ostras foram utilizados para a realização das análises de contaminantes orgânicos, em ambos os experimentos. As ostras coletadas para análises químicas foram conservadas a -20 °C em papel alumínio, para a análise de orgânicos, ou plástico, para a análise de metais. No Experimento I, um grupo de ostras foi coletado no LMM (Praia do Sambaqui) para verificação dos níveis de contaminantes nas ostras antes do início do experimento de exposição (“tempo zero”).

6.3.2. Monitoramento hidroquímico e microbiológico no experimento de campo

Amostras de água foram coletadas no primeiro, sétimo e décimo quarto dia de cada exposição (Experimento I e II). Análises de parâmetros microbiológicos (coliformes totais e fecais), e físico-químicos da água, como amônia, nitrato, nitrito, fosfato, silicato (N-NH₄, N-NO₃, N-NO₂, P-PO₄ e SiO₃), clorofila (a, b e c) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foram realizadas segundo técnicas padrões (APHA-AWWA-WPCF, 1999). Parâmetros físicos e químicos da água como temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e turbidez, bem como profundidade foram registrados no momento da coleta com um medidor multiparamétrico da marca YSI.

6.3.3. Análises químicas em *C. rhizophorae*

Para a análise de contaminantes orgânicos amostras de *C. rhizophorae* foram processadas no Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da USP (IOUSP). O material biológico congelado foi seco durante 72 horas em liofilizador Thermo Savant – modulyo D. Em seguida, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente. O procedimento metodológico descrito a seguir foi baseado em MacLeod e colaboradores (1986) com algumas modificações. Um grama de cada uma das amostras foi extraído com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em sistema *soxhlet* durante 8 horas. Foram utilizados solventes com grau de pureza “para análise de resíduos orgânicos” (J. T. Baker, Estados Unidos). Antes da extração foram adicionados 100 µL dos padrões internos (surrogate) com

diferentes concentrações no branco e em cada uma das amostras. Para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) foram adicionados naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12 (5 ng μl^{-1}); para os bifenilos policlorados (PCBs) e pesticidas organoclorados foram utilizados o PCB-103 e PCB-198 (1 ng μl^{-1}); o padrão interno dos alquilbenzeno lineares (LABs) foi o dodecil alquilbenzeno (1C12LAB, 5 ng μl^{-1}). O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 g de sílica gel sobre 16 g de alumina (Merck) desativadas 5% com água pré-extraída e 1 g de sulfato de sódio (J. T. Baker) no topo. A eluição foi feita com 80 ml de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 ml e injetado no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. O eluato foi concentrado novamente e foram adicionados os padrões internos cromatográficos (octacloronaftaleno para PAHs, TCMX para PCBs e pesticidas e 1C19LAB para os LABs). O volume final foi de 1 ml. Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) da Agilent Technologies para análise de pesticidas organoclorados. Os demais grupos de compostos (PAHs, PCBs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies. As temperaturas do injetor e detector do GC-ECD foram de 280 °C e 300 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio ultrapuro e o gás auxiliar foi o nitrogênio. A coluna cromatográfica era de 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 5% fenilmetilsiloxana de 0,5 μm da marca J&W Scientific. A rampa de temperatura utilizada foi: início a 70 °C por 1 min, aumento a uma taxa de 40 °C até 170 °C e a 1,5 °C até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 2 min, e aumentando novamente a 15 °C até 300 °C permanecendo isotérmico por 5 min. As temperaturas do GC-MS foram de 280 °C, 280 °C e 300 °C no injetor, na interface e na fonte de íons, respectivamente. A coluna cromatográfica utilizada foi da J&W Scientific com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons). A rampa de temperatura para PCBs foi: início a 75 °C durante 3 min, aumento a uma taxa de 15 °C até 150 °C e a 2 °C até 260 °C e a 20 °C até 300 °C permanecendo constante durante 1 min. A rampa para

os PAHs e LABs teve início em 40°C com aumento a taxa de 20°C até 60°C e a 5°C min⁻¹ até 290°C onde permaneceu por 5 min e aumento a 10 °C até 300 °C onde permaneceu constante durante 10 min. A identificação dos pesticidas, PAHs, PCBs e LABs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC-MS também foram identificados através do espectro de massa. A quantificação foi feita por razões entre os *surrogates* e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 5 concentrações diferentes de cada grupo de compostos

As análises de metais foram realizadas no Laboratório de Hidroquímica da Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, segundo metodologia descrita por Baraj et al. (2003). O material biológico foi pesado, seco e homogeneizado com um mixer de plástico e armazenado em plásticos a 4°C. Todos os reagentes usados foram grau Suprapur e água Milli-Q e os recipientes de vidro, submetidos a uma limpeza cuidadosa (M.E.S.L., 1997). A manipulação das amostras foi realizada em capela de fluxo laminar. Aproximadamente 0,5 g de amostra foi digerida com 5 ml HNO₃ em tubos de Teflon para decomposição e transferidas para frascos de 25 ml. Uma alíquota da amostra digerida foi tratada com BrCl, anteriormente a determinação de Hg, para oxidar e converter qualquer forma orgânica de mercúrio em mercúrio inorgânico (M.E.S.L., 1997). Um sistema laboratorial de vapor frio, acoplado a um espectrômetro de absorção atômica (AAS) CG-AA 7000 foi usado para determinação de Hg. Fe, Mn, Zn e Cu em chama ar-C₂H₂ usando um instrumento AAS CG-AA 7000 e Cd, Pb e Cr em um ZEISS-5 em modo de atomização eletrotérmica. A acurácia dos resultados analíticos foi checada pela análise de material referência Tuna 350 (M.E.S.L, IAEA, Monaco). Resultados obtidos para amostras referência estavam em concordância (+8%) com os valores certificados.

6.3.4. Análises de biomarcadores bioquímicos em *C. rhizophorae*

As amostras de brânquia e glândula digestiva foram homogeneizadas em tampão (Tris-HCl 20mM, pH 7,6, EDTA 1mM, sacarose 0,5M, KCl 0,15M, DTT 1mM, PMSF 0,1mM) na proporção de 1 g de tecido para 4 mL de tampão (1:4), e centrifugadas a 9.000 x g durante 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, separado em alíquotas e estocado em freezer - 80°C. O ensaio da catalase

(CAT) foi realizado segundo a técnica descrita por Aebi (1984) que quantifica a velocidade de decomposição do H_2O_2 , através do decréscimo de absorvância lido em espectrofotômetro a 240 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), durante 1 min. A atividade enzimática foi expressa em unidades de CAT / mg de proteína, onde uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de H_2O_2 por min a 30°C . A determinação da atividade da glutathione *S*-transferase total foi realizada segundo o ensaio descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), que se baseia na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH. O aumento de absorvância da amostra foi registrado em um espectrofotômetro a 340 nm, durante 2 min. A atividade enzimática foi expressa em mili unidades de GST / mg de proteínas, sendo que uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima que conjuga 1 μmol de CDNB por min a 25°C . A determinação da enzima glutathione redutase (GR) foi avaliada pelo decréscimo de absorvância no comprimento de onda de 340 nm, causado pela oxidação da coenzima NADPH utilizada como doadora de elétrons para a enzima para formar o produto GSH (glutathione reduzida) a partir do substrato glutathione oxidada (GSSG). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática da glutathione redutase (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada através do aumento de absorvância provocado pela redução da coenzima $NADP^+$ a NADPH, pela desidrogenação do substrato glicose-6 fosfato (G6P), no comprimento de onda de 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (GLOCK; MCLEAN, 1953). A concentração de proteínas totais presentes na fração celular citoplasmática foi calculada segundo a técnica descrita por Peterson (1997), utilizando soro albumina bovina como padrão, e utilizada na normalização das análises de cinética enzimática.

6.3.5. Identificação de genes diferencialmente expressos em *C. rhizophorae* expostas ao esgoto doméstico utilizando a técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH)

Brânquias de ostras expostas por 14 dias no local contaminado (SJ1) ou no local referência (SJ4) no experimento II foram utilizadas para extração de RNA total, utilizando reagente TRIZOL (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA total foi checada em espectrofotômetro a 260 nm e através do perfil eletroforético das amostras extraídas, separadas em gel de agarose e o RNAm purificado com o kit *Oligotex Mini* (Qiagen). O mesmo procedimento foi

realizado para obtenção de RNAm de glândulas digestivas de ostras expostas por 24 hs no local poluído (SJ1) ou no local referência (SJ4) no experimento II a partir de RNA total. As amostras foram concentradas por precipitação com acetato de sódio 3M e a concentração do RNAm foi verificada em espectrofotômetro a 260 nm para ajuste do volume necessário para obtenção de 1-2 ug a serem utilizadas na síntese do cDNA para a hibridização subtrativa supressiva utilizando-se o kit *PCR Select cDNA Subtraction* (Clontech). Este kit permite a hibridização dos fragmentos de cDNA comuns a dois grupos, enquanto os fragmentos diferencialmente expressos são amplificados por reações de PCR ao final do procedimento. Dessa forma, obtêm-se os genes diferencialmente expressos em cada um dos grupos.

Como esta metodologia permite apenas a hibridização de cDNAs de duas populações de RNAm, foi realizada a comparação entre as ostras mantidas no local poluído (SJ1) com aquelas mantidas no local referência (SJ4). Além disso, o experimento de hibridização subtrativa supressiva foi realizado nos dois sentidos (poluído-referência e referência-poluído) permitindo, dessa forma, identificar tanto os genes que tiveram sua expressão induzida, como aqueles que tiveram sua expressão inibida nas ostras mantidas no local poluído. O funcionamento da metodologia foi verificado através de um controle interno do Kit. Após, os cDNAs obtidos para o local referência e poluído foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and gel band Purification* (Amersham Biosciences – GE) para posterior clonagem e sequenciamento.

O sequenciamento dos fragmentos de cDNA clonados foi realizado no Laboratório de Protozoologia (UFSC), em colaboração com o Prof. Dr. Edmundo Carlso Grisard. A extração plasmidial foi realizada por lise alcalina das colônias crescidas em 1 mL de meio líquido. A reação de amplificação dos fragmentos contidos nos plasmídeos foi realizada utilizando-se o kit *DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado no equipamento MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). As sequências obtidas foram primeiramente submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa Phred (*Phred* ≥ 15), do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998)

Todas as sequências obtidas foram verificadas no programa *VecScreen* (GenBank) para retirada de sequências de vetor e adaptadores e posteriormente foram analisadas pelo programa CAP3

(HUANG; MADAN, 1999) para formação de *contigs*. Os *contigs* e *singletons* obtidos foram comparados com o GenBank utilizando o programa BLAST2GO (CONESSA, 2005). Para uma análise inicial foi utilizado o algoritmo BLASTx com filtro de *e-value* mantido em 10^{-3} realizando a busca no GenBank. As sequências que não apresentaram similaridade para sequências do GenBank foram analisadas individualmente após uma nova busca por sequências homólogas utilizando o algoritmo tBLASTx. No caso de algumas sequências, buscas em bancos de ESTs de moluscos bivalves utilizando BLASTn no GenBank, também foram realizadas.

6.3.6. Uso de iniciadores para identificação de novos genes em *C. rhizophorae* por PCR

Além da biblioteca subtrativa, foram utilizadas outras estratégias baseadas na técnica de PCR para a identificação de novos genes potenciais biomarcadores de contaminação aquática em *C. rhizophorae*. A primeira foi a utilização de iniciadores para amplificação gênica através da técnica de PCR desenhados, a priori, para sequências específicas da ostra *C. gigas* e obtidas a partir de um experimento prévio que identificou genes induzidos em ostras expostas ao esgoto doméstico em laboratório (MEDEIROS, 2008). A segunda estratégia compreendeu a utilização de iniciadores degenerados para amplificação do gene da *CAT* em *C. rhizophorae*. Este gene foi escolhido com base nos resultados de biomarcadores bioquímicos obtidos na seção 6.4.3. (página 41), que mostraram que a atividade desta enzima apresentou uma boa correlação com a contaminação por esgoto doméstico.

Um pool de amostras de brânquias de ostras coletadas no experimento I, no local SJ 1, tiveram seu RNA total extraído (TRIZOL, Invitrogen) e seu cDNA foi sintetizado utilizando o kit *Omniscript Reverse Transcriptase* (Qiagen) para amplificação de novos genes em *C. rhizophorae* por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores utilizados por Medeiros (2008), desenhados previamente com base em sequências identificadas na espécie *C. gigas*, foram testados em *C. rhizophorae* no presente estudo. A Tabela 1 mostra os iniciadores de *C. gigas* testado para amplificação de produtos de PCR de tamanho esperados em *C. rhizophorae*. O programa utilizado para as reações de PCR foi similar para todos os iniciadores testados: 1 ciclo de desnaturação inicial (30s; 90 °C); ~35 ciclos com desnaturação (30s; 90 °C), anelamento (30s; 40°C, 45°C, 50°C ou 55°C) e extensão (1s; 72°C); e manutenção a 4°C.

Iniciadores degenerados foram desenhados para amplificação do gene *CAT* em *C. rhizophorae* com base em sequências de aminoácidos de moluscos (*Chlamys farreri*, ABI64115; *C. gigas*, ABS18267, *Haliotis discus discus*, ABQ60044), artrópodes (*Aedes aegypti*, EAT34333; *Litopenaeus vannamei*, AAR99908) e vertebrados (*Gallus gallus*, CAG31019 e *Danio rerio*, AAF89686) obtidas no GenBank. Cinco regiões altamente conservadas e com pouca degeneração, calculada com base em códons de eucariotos, foram escolhidas para o desenho dos iniciadores degenerados (Tabela 2) e testado para amplificação de produtos de PCR de tamanho esperados em *C. rhizophorae*. O programa utilizado para as reações de PCR foi similar para todos os iniciadores testados: 1 ciclo de denaturação inicial (30s; 90°C); 40 ciclos com denaturação (30s; 90°C), anelamento (45s; 40°C, 45°C, 50°C e 55°C), extensão (1min-72°C) e manutenção a 4°C.

Tabela 1. Iniciadores dos genes citocromo P450 356A1 (*CYP356A1*), proteína ligante de ácidos graxos (*FABP*), glutionina *S*-transferase ômega (*GST-O*), proteína de resistência a múltiplas drogas (*MDR*), actina (*ACT*) e 5-aminolevulinato sintase (*ALAS*) de *C. gigas* que foram testados em *C. rhizophorae*, e os tamanhos de produtos de PCR esperados.

Gene	5' - 3'	produto (pb)
CYP356A1	GAAACGCTCTCAGGCATTATCT CCTCTTGACATTTTGCTTGG	597
FABP	GTTTGAGGGAAACTGGGAATGC TCCGTCGGAAATATGTCAGTTTAGC	255
GSTO	GGTGTATCCCGATAACAAGCTGAC CTGAGGGTCCAGTCGACATTTTT	362
MDR	GGCAGTCATGTTCTTTGCCTATG GCAGCCATTGGACATTTAGATCCT	443
ACT	GGAAATTCGCCAACAGAGAAAAGATGAC CGCGGATCCTTCGTTGCCAATGGTIGATGA	436
ALAS	AGACCTCACTCATCCGGACAGACAG CTTCACTACCACTCTCCTCCCACCAC	427

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose, purificados, ligados no vetor *pGEM-T Easy Vector* (Promega) e inseridos em bactérias *E. coli* JM109. Plasmídeos contendo o inserto, selecionados por coloração foram purificados a partir de culturas (QiaPrep, Qiagen) e sequenciados como descrito acima. Os iniciadores que não amplificaram produtos no tamanho esperado foram testados novamente com ajustes nas temperaturas de anelamento e aumento na concentração de iniciadores (2 ou 4 vezes).

Tabela 2. Iniciadores degenerados utilizados para amplificação do gene da catalase (*CAT*) em *C. rhizophorae*.

	5' - 3'	degeneração
senso	ACYCAYCARGTRTCCTTCCTG	16
senso	CANGARGAYGGNAAYTGG	128
senso	GCNTTYGGNTAYTTYGAR	256
antisenso	CATYTTTRTCKGGRCTRGCYTC	64
antisenso	RAARTCCCARAACATRTC	16

6.3.7. Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Iniciadores específicos para genes de *C. rhizophorae* (Tabela 3) foram desenhados (Primer3; ROZEN; SKALETSKY, 2000) e obtidos da empresa *MWG Biotech*. PCR em tempo real foi realizado usando o reagente *iQ SYBR Green Supermix* de acordo com as instruções do fabricante e um sistema de detecção *iQ Real-Time PCR* (Biorad). Cada amostra foi analisada em triplicata com o seguinte protocolo: 95°C por 30s e 40 ciclos de 95°C por 15s e 62°C por 1 min. Análise da curva de fusão (*melting curve*) foi realizada nos produtos de PCR no final de cada análise a fim de garantir que um único produto fosse amplificado. O método $E^{\Delta Ct}$ foi utilizado para cálculo do nível de expressão gênica para cada amostra, usando actina (*ACT*) como gene normalizador.

Tabela 3. Iniciadores desenhados para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes *CAT* (catalase), *SDR* (desidrogenase de cadeia curta), ferritina, cavortina e *ACT* (actina) em *C. rhizophorae*.

gene		5' - 3'
CAT	senso	ATACCGCAGAATGAACGGCTACG
	antisenso	CAGTGGAAATTTGCAGTAGACAG
SDR	senso	AAGGTTCCGGTGAACCAAGCGAGT
	antisenso	TGGTCTCGCCAGTGATGTAGGAG
ferritina	senso	CAACCAATCCCTGCTTGACCTTC
	antisenso	CCTTGATGGCGTTCACTTGTTC
cavortina	senso	ATTGGCTGACCATCGGACACAAC
	antisenso	ATGGCGGTATGGCTAGTGTGGTC
ACT	senso	GTGATCTGACCGATTACCTCAT
	antisenso	GATGTCTCTGACGATTTCTCTC

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Monitoramento físico, químico e microbiológico da área de estudo

Durante os dois experimentos de campo realizados com as ostras *C. rhizophorae* alguns parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água foram avaliados, e os resultados podem ser visualizados na Tabela 4 e 5, para os experimentos I e II, respectivamente.

Tabela 4. Resultados hidroquímicos e microbiológicos medidos na água de superfície (~30cm prof.) nos locais de exposição durante o experimento I. SJ1 indica o local mais próximo ao Rio Bucheler (poluído) enquanto SJ4 indica o local mais afastado (referência). Os parâmetros temperatura (temp.; °C), oxigênio dissolvido (mg O₂ / l, 5 dias), pH, salinidade (sal.; PSU), demanda bioquímica de oxigênio (DBO; mg / l O₂), turbidez (turb.; NTU), amônia, nitrato, nitrito, fosfato, silicato (N-NH₄, N-NO₃, N-NO₂, P-PO₄ e SiO₃, respectivamente; µg / l), clorofila (clor.-a, clor.-b e clor.-c, respectivamente; µg / l) coliformes totais e fecais (coli. tot. e coli. fec; NMP / 100ml). <LDM, abaixo do limite de detecção do método.

	SJ 1			SJ 2			SJ 3			SJ 4		
	dia 1	dia 7	dia 14	dia 1	dia 7	dia 14	dia 1	dia 7	dia 14	dia 1	dia 7	dia 14
Temp.	18,2	16,9	19,9	18,2	16,8	20,1	17,9	16,6	20,2	17,6	16,5	20,4
O ₂	6,93	6,68	3,76	8,54	8,09	7,10	7,68	7,20	8,60	7,51	7,33	7,43
pH	7,93	7,42	7,41	7,68	7,40	7,79	7,95	7,81	7,49	7,94	7,84	7,45
sal.	32	32	27	32	33	33	32	33	33	33	33	32
DBO	9,12	3,63	5,10	2,98	2,05	1,80	1,10	4,13	0,60	4,87	0,79	6,00
turb.	44,4	29,3	64,2	14,0	6,2	14,0	9,1	8,3	8,3	10,8	9,0	17,4
N-NH ₄	225	219	1002	31	91	59	50	191	5	21	141	50
N-NO ₃	2	<LDM	<LDM	176	6	<LDM	85	147	<LDM	104	<LDM	<LDM
N-NO ₂	6	4	23	2	2	<LDM	1	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
P-PO ₄	35	56	297	32	9	16	12	10	14	16	13	11
SiO ₃	470	480	1600	480	430	520	510	390	530	500	470	530
clor.-a	1,07	0,5	0,2	1,08	0,20	0,37	0,45	0,17	0,44	0,31	0,21	0,21
clor.-b	1,23	0,68	0,28	1,27	0,25	0,48	0,57	0,15	0,45	0,36	0,21	0,48
clor.-c	0,28	0,11	0,08	0,55	0,09	0,24	0,16	0,03	0,15	0,04	0,05	0,10
coli. tot.	30.000	3.000	50.000	3.000	220	500	220	20	230	210	<LDM	1.100
coli. fec.	16.000	2.300	24.000	3.000	170	80	80	<LDM	230	60	<LDM	80

Tanto no experimento I, como no experimento II, não foram observadas variações importantes em parâmetros abióticos como salinidade, temperatura e pH. A ausência de variação nestes parâmetros foi observada tanto entre os diferentes locais amostrados (SJ1, SJ2, SJ3 e SJ4 ou SJ1 e SJ4, nos experimentos I ou II, respectivamente), como entre os diferentes tempos de coleta (dias 1, 6 e 7 ou dias 0, 1, 2, 7 e 15, para os experimentos I ou II, respectivamente).

Tabela 5. Resultados hidroquímicos e microbiológicos medidos na água de superfície (~30cm prof.) nos locais de exposição durante o experimento II. SJ1 indica o local mais próximo ao Rio Bucheler (poluído) enquanto SJ4 indica o local mais afastado (referência). Os parâmetros temperatura (temp.; °C), pH, salinidade (sal.), demanda bioquímica de oxigênio (DBO; mg / l O₂), coliformes totais e fecais (coli. tot. e coli. fec; NMP / 100ml). <LDM, abaixo do limite de detecção do método. “-” análise não foi realizada.

	SJ 1					SJ 4				
	dia 0	dia 1	dia 2	dia 7	dia 14	dia 0	dia 1	dia 2	dia 7	dia 14
Temp.	30,0	28,0	27,5	28,0	27,5	27,5	28,0	27,0	26,5	-
pH	8,27	8,04	7,86	7,89	8,12	7,85	7,89	7,94	7,94	7,98
sal.	36	35	34	36	32	37	37	37	36	34
DBO	-	-	5,06	6,36	1,62	-	-	2,31	4,41	1,55
coli. tot.	-	-	24.000	8.000	11.000	-	-	<LDM	1.100	2.100
coli. fec.	-	-	20.000	8.000	7.000	-	-	<LDM	240	900

Os valores de coliformes fecais, considerados marcadores de contaminação por esgoto doméstico, ultrapassaram o limite definido pela Resolução Conama Nº 357/2005 (CONAMA, 2005) na grande maioria das análises, uma vez que esta norma estabelece em 43 NMP/100 ml o limite permitido para o cultivo de moluscos marinhos. Tais valores acima do permitido pela legislação, foram observados mesmo no local considerado referência (SJ4), em aproximadamente 66 % das coletas realizadas, em ambos os experimentos. Apesar disso é notável um maior valor deste parâmetro, assim como de coliformes totais e de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), no local SJ1 em relação aos locais SJ2, SJ3 e SJ4 no experimento I, assim como no local SJ1 em relação ao local SJ4 no experimento II (Tabela 5). Além disso, a análise de coliformes fecais na água do experimento I, sugere um gradiente de contaminação por esgotos domésticos à medida em que há um afastamento em relação ao Rio Bucheler, com valores médios calculados a partir da tabela 4 de 14.100, 1.083, 103 e 47 NMP/100 ml para os locais SJ1, SJ2, SJ3 e SJ4, respectivamente. No experimento II as médias de coliformes fecais obtidas a partir das três análises realizadas foram de 14.000 e 120 para os locais SJ1 e SJ4 respectivamente.

Outros parâmetros, indicadores da presença de aporte de matéria orgânica oxidável, como menor teor de oxigênio dissolvido, e maiores níveis de turbidez, amônia (N-NH₄), nitrito (N-NO₂) e fosfato (P-PO₄) dissolvidos, medidos no experimento I, também apresentaram maiores níveis no local SJ1 (Tabela 4). Apesar disso não foi observada diferença na concentração de clorofila, sugerindo a presença de quantidade de alimento similar para os diferentes locais, independentemente da presença ou não da poluição por esgoto doméstico.

Um maior número de parâmetros foi analisado no experimento I, se comparado ao experimento II, possibilitando uma melhor caracterização deste local neste experimento. Porém o monitoramento dos parâmetros analisados em ambos os experimentos, validaram a possibilidade de utilização destes locais de estudo para a avaliação do efeito do esgoto doméstico em biomarcadores bioquímicos e moleculares das ostras. Além disso, aparentemente, estes locais não possuem diferenças importantes em outros parâmetros físicos e químicos da água, exceto aqueles associados ao impacto direto do esgoto doméstico não tratado, o que também apresentou-se como uma característica desejável para a realização das análises dos experimentos neste local.

6.4.2. Monitoramento de contaminantes orgânicos e metais nas ostras

Contaminantes orgânicos de diferentes classes foram analisadas em ostras *C. rhizophorae* mantidas por duas semanas nos locais escolhidos para os experimento I e II. Os somatórios das concentrações de isômeros ou congêneres para cada classe de contaminantes, são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Somatório das concentrações dos isômeros orgânicos para as classes alquilbenzenos lineares (Σ LABs, 25 isômeros), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Σ PAHs, 33 isômeros), bifenilas policloradas (Σ PCBs, 47 congêneres) e pesticidas organoclorados (Σ HCH, 4 isômeros; Σ Clordanos, 6 isômeros; Σ DDTs, 6 isômeros e Σ Drins, 3 isômeros) em amostras de tecido de ostras. SJ1 indica o local mais próximo ao Rio Bucheler (poluído), SJ4 indica o local mais afastado (referência). Sam representa o local de cultivo da Paia de Sambaqui, onde as ostras foram obtidas. Os resultados estão expressos como ng / g de peso seco de ostra. <LDM, abaixo do limite de detecção do método.

	Experimento I					Experimento II	
	Sam	SJ 1	SJ 2	SJ 3	SJ 4	SJ 1	SJ 4
Σ - LABs	171	382	230	232	135	348	214
Σ - PAHs	5,5	39,9	<LDM	<LDM	<LDM	16,4	<LDM
Σ - PCBs	<LDM	3,0	<LDM	<LDM	<LDM	2,8	<LDM
Σ - HCH	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Σ - Clordanas	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Σ - DDTs	<LDM	7,6	<LDM	<LDM	<LDM	7,6	<LDM
Σ - Drins	<LDM	<LDM	2,2	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM

Os alquilbenzenos lineares (LABs) foram utilizados como marcadores da presença de esgotos no ambiente aquático. Os LABs totais (somatório dos 26 isômeros de LABs) variaram de 135 a 382 ng por grama de peso seco de ostras analisadas (Tabela 6). As concentrações mais altas foram detectadas em ostras expostas ao local SJ1, tanto no experimento I como no experimento II (382 e 348 ng por

grama de peso seco, respectivamente). No experimento I foi observada uma diminuição gradual de LABs conforme aumentou a distância do local poluído SJ1. Portanto, os resultados de LABs em ostras, corroboraram o gradiente de contaminação por esgoto doméstico verificado em água pelas análises microbiológicas. Como esperado, o menor nível de LAB foi observado no local mais afastado da desembocadura do Rio Bucheler (SJ4; 135 ng por g) seguido pela concentração de LABs nas ostras coletadas no cultivo de Sambaqui, no momento de obtenção das ostras, antes do período de exposição.

As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais (PAHs) em ostras *C. rhizophorae* variaram de <LDM a 39,9 ng por g de peso seco. Nos experimentos I e II foram observados níveis detectáveis nos animais mantidos no local SJ1 (39,9 e 16,4 ng por g de tecido, respectivamente). Níveis menores de PAHs (5,47 ng por g de tecido), foram observados também nos animais mantidos no Sambaqui, antes do início da exposição. Dentre os 33 isômeros de PAHs analisados, foram identificados apenas metilfenantreno, fluoranteno, pireno e criseno. Em SJ1 no experimento I, a representatividade destes isômeros foi de 38%, 8%, 11% e 43 % do total, para metilfenantreno, fluoranteno, pireno e criseno, respectivamente (dados não mostrados). Dentre os isômeros de PAHs identificados em SJ1 no experimento II, estão metilfenantreno, fluoranteno e pireno (45%, 30% e 25 % do total, respectivamente) (dados não mostrados). Criseno foi o único PAH encontrado nos animais coletados na Praia do Sambaqui.

Bifenilas policlorados (PCBs) foram detectados apenas nas amostras de ostras expostas ao local SJ1, tanto no experimento I como no experimento II (3,05 e 2,79 ng por g de tecido, respectivamente). Dentre os 47 congêneres analisados, foram observados apenas os congêneres PCB114 (2,3,4,4',5-Pentaclorobifenila) e PCB153 (2,2',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila) para o experimento I e PCB138 (2,2',3,4,4',5'-Hexaclorobifenila) para o experimento II, porém em concentrações muito próximas do limite de detecção. Nenhum dos PCBs detectados estão no grupo dos congêneres planares não-orto substituídos, classe essa considerada classicamente como de maior risco ambiental dentre os 209 congêneres de PCB existentes.

Dentre os pesticidas organoclorados analisados, foram detectadas concentrações de DDTs apenas nos animais mantidos no local SJ1, em ambos os experimentos, e Drins apenas nos animais do local SJ2 no experimento II. Os DDTs no experimento I e II apresentaram concentrações de 7,62 e

7,64 ng por g de tecido, respectivamente. Dentre os 5 DDTs analisados, foram detectados apenas as isoformas congêneres DDE e DDD (~75 e 25 % de representatividade, respectivamente) em ambos os experimentos. Dentre os 3 isômeros de drins analisados, o único a ser detectado foi o Aldrin, na concentração de 2,21 ng por g de tecido. Não foram detectados HCHs ou Clordanas em ambos os experimentos.

Tabela 7. Concentração de metais nas ostras *C. rhizophorae* mantidas nos locais de exposição durante o experimento II ($\mu\text{g} / \text{g}$ de tecido). SJ1 indica o local mais próximo ao Rio Bucheler (poluído) enquanto SJ4 indica o local mais afastado (referência). * e ** indicam limites de tolerância para moluscos bivalves de acordo com “Food and Drugs Administration (FDA) Guidance Document” e Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, ABIA, respectivamente (Isla, 2000). <LDM, abaixo do limite de detecção do método.

	Experimento I					Experimento II		
	Sam	SJ 1	SJ 2	SJ 3	SJ 4	SJ 1	SJ 4	
Cr	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	0.42	0.43	13 *
Pb	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	0.10	0.05	1,7 *
Mn	<LDM	<LDM	<LDM	36,1	42,5	22.8	16.4	
Zn	221,5	149,4	228,7	365,0	250,3	234,1	163,9	250 **
Cu	<LDM	33.4	<LDM	<LDM	34.9	7.25	4.65	150 **
Hg	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	0.07	0.17	1 *
Fe	411.5	465.8	294.2	466.8	467.7	319	275	

Na maior parte das análises, os níveis de metais das ostras estiveram abaixo dos níveis máximos permitidos para consumo humano (Tabela 7). Apenas os níveis de Zn no local SJ3, no experimento I, estiveram acima (365,0 ng por g de tecido) dos limites estabelecidos pela legislação para consumo (250 ng por g de tecido). Porém níveis próximos a este limite (221,6 ng por g de tecido), foram observados nas ostras do tempo zero oriundas da Praia do Sambaqui. Os baixos níveis de metais detectados nas ostras indicam que não há uma contaminação expressiva desta classe de contaminantes nos locais de exposição. Diferentemente do que foi observado para a maioria dos contaminantes orgânicos quantificados nas ostras (Tabela 6), nenhum gradiente claro de concentração foi observado para os metais analisados nos animais do experimento I. Porém, níveis maiores de Pb, Mn, Zn, Cu e Fe foram observados nos animais mantidos no local contaminado SJ1, no experimento II.

Os resultados das análises químicas em *C. rhizophorae* sugerem que as ostras coletadas em Sambaqui não estiveram expostas aos contaminantes analisados antes do transplante para os locais de estudo onde foram realizados os experimentos I e II.

6.4.3. Análises de biomarcadores bioquímicos

As respostas dos biomarcadores bioquímicos de contaminação aquática, representados pela atividade das enzimas CAT, GST, G6PDH e GR, foram avaliadas nos dois experimentos de campo realizados na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina nas imediações do município de São José (Figuras 3, 4, 5 e 6).

No experimento I, tanto as análises em brânquias, como em glândula digestiva de ostras *C. rhizophorae*, apresentaram maiores valores da atividade da enzima CAT no local SJ1 em relação aos outros três locais (Figura 3). Além disso, no mesmo experimento, foi observada atividade decrescente desta enzima a medida que os locais de coleta se afastavam da desembocadura do Rio Bucheler. Este padrão de resposta foi bastante semelhante ao padrão observado para as análises de marcadores de esgoto analisados em água, ex.: coliformes fecais, e em ostras, ex.: LABs. Tal similaridade nos padrões foi confirmada por uma forte correlação positiva da atividade da CAT em ambos os órgãos analisados, com a média dos valores do marcador da presença de esgoto doméstico, coliformes fecais, analisados na água para os diferentes locais ($r=0,981$ e $r=0,976$, para brânquia e glândula digestiva, respectivamente; Figura 4). Os biomarcadores GST, G6PDH e GR não apresentaram diferenças estatísticas entre os locais analisados no experimento I (Figura 3), ou correlação significativa com coliformes fecais em água (dados não mostrados), tanto para brânquia, quanto para glândula digestiva.

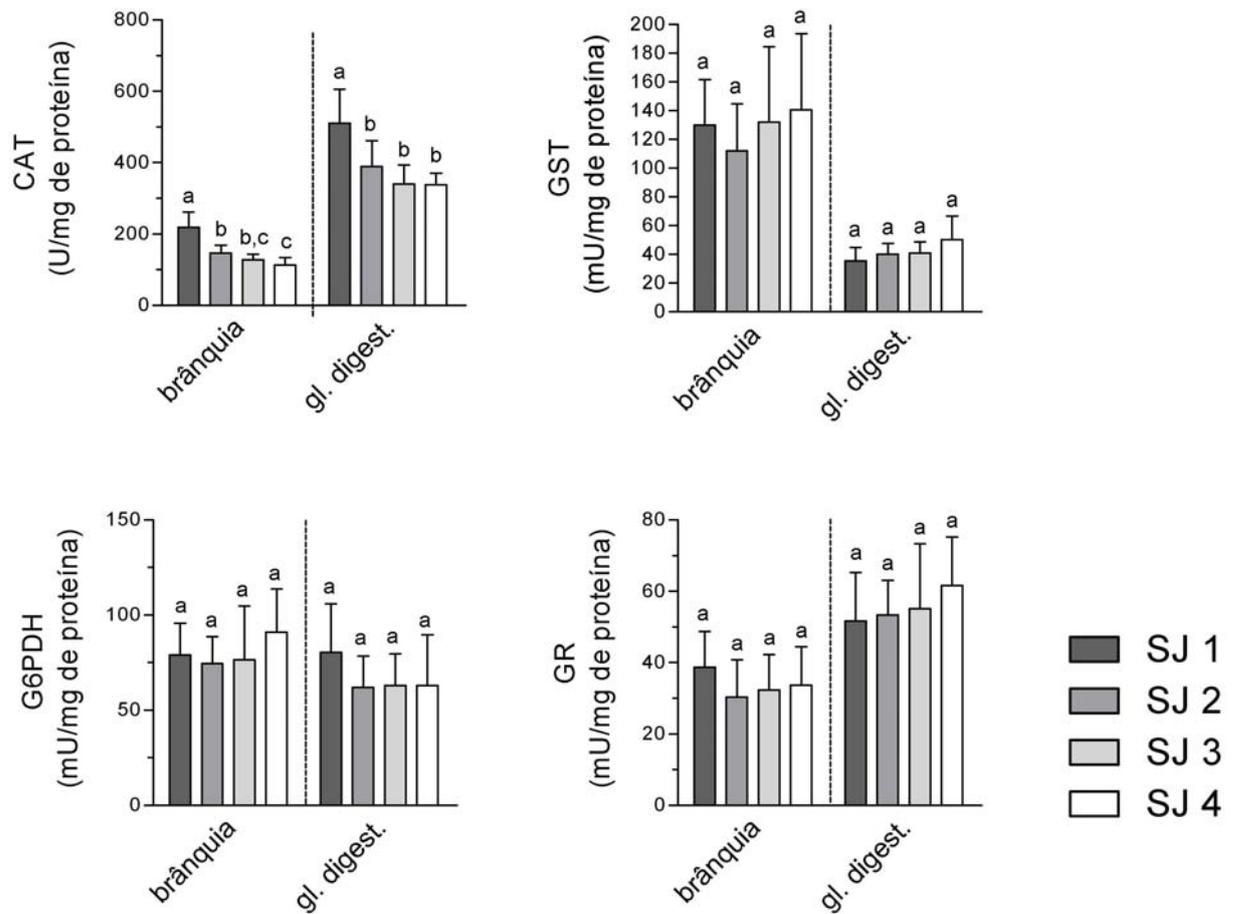


Figura 3. Experimento I: Atividade das enzimas catalase (CAT), glutiona *S*-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutiona redutase (GR) em brânquias e glândula digestiva de *C. rhizophorae* mantidas nos locais de exposição durante o experimento de inverno. SJ1 indica o local mais próximo ao Rio Bucheler (poluído) enquanto SJ4 indica o local mais afastado (referência). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os locais ($p > 0,05$; $n = 6-10$).

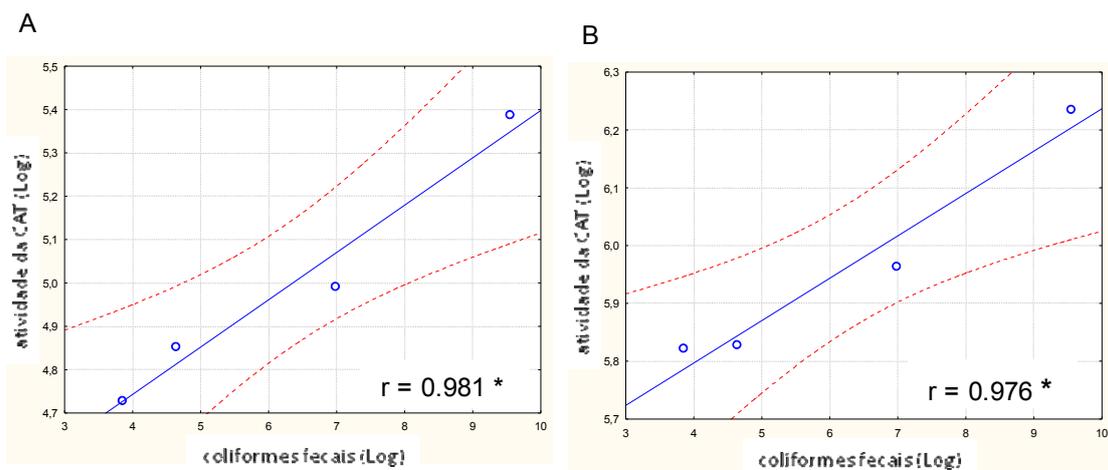


Figura 4. Experimento I: Correlação entre as médias de atividade da catalase em brânquias (A) e glândulas digestivas (B) de *C. rhizophorae* com as médias de coliformes fecais (CF) obtidas nos locais de coleta. * indica correlação significativa (coeficiente de correlação de Pearson; $p < 0,05$). Os dados foram transformados logaritmicamente para obtenção de um melhor ajuste linear dos dados.

Assim como no experimento I, no experimento II foi observada uma maior atividade da CAT na brânquia e na glândula digestiva das ostras expostas por duas semanas no local SJ1 (contaminado), do que as mantidas no local SJ4 (referência) (Figura 5). As atividades da GST e GR das ostras expostas em SJ1 e SJ4 não apresentaram diferenças significativas. Porém foi observada uma tendência de menor atividade da GST em glândula digestiva de ostras do local SJ1, em relação ao local SJ4. Diferentemente do observado no experimento I, no experimento II foi observada uma maior atividade da enzima G6PDH em brânquias de ostras do local SJ1, em relação a SJ4 (Figura 5).

No experimento II foi analisada a resposta temporal da atividade da CAT em brânquia das ostras mantidas nos locais SJ1 e SJ4 (Figura 6). Após 24h de exposição, nenhuma alteração na atividade da CAT foi observada nos animais de ambos locais, o que sugere que este tempo de exposição não é suficiente para evidenciar respostas para o esgoto doméstico em campo utilizando este biomarcador bioquímico. Porém, após 48 horas de exposição foi observado uma maior atividade da CAT nos animais do local contaminado, que se manteve até 2 semanas (Figura 6).

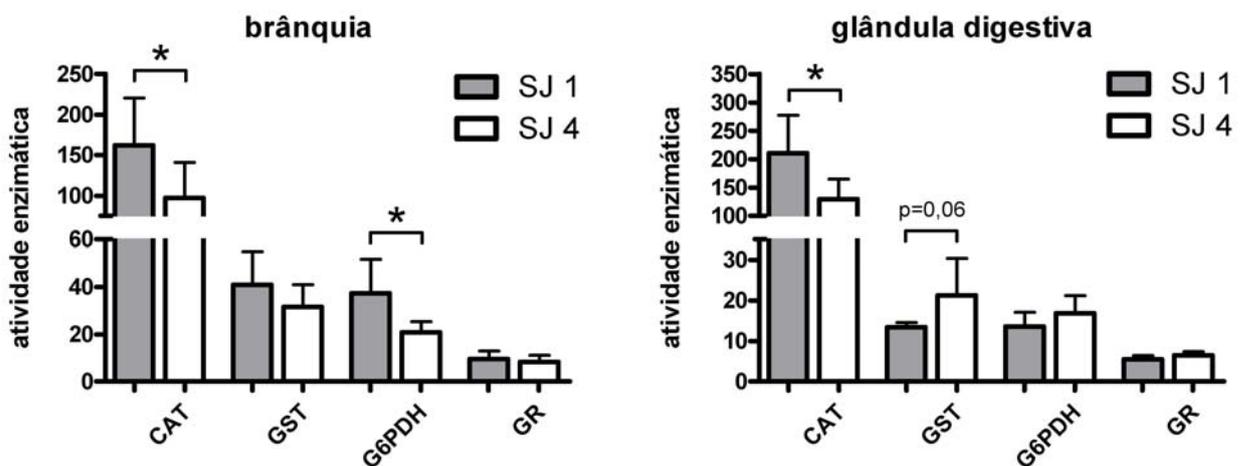


Figura 5. Experimento II: Atividade das enzimas catalase (CAT), glutiona *S*-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutiona redutase (GR) em brânquias e glândula digestiva de *C. rhizophorae* mantidas nos locais SJ1 (contaminado) e SJ4 (referência) por 2 semanas. * indica diferença estatística entre SJ1 e SJ4 ($p < 0,05$). A atividade enzimática da CAT está expressa com U / mg de proteína, enquanto GST, G6PDH e GR estão expressas como mU / mg de proteína.

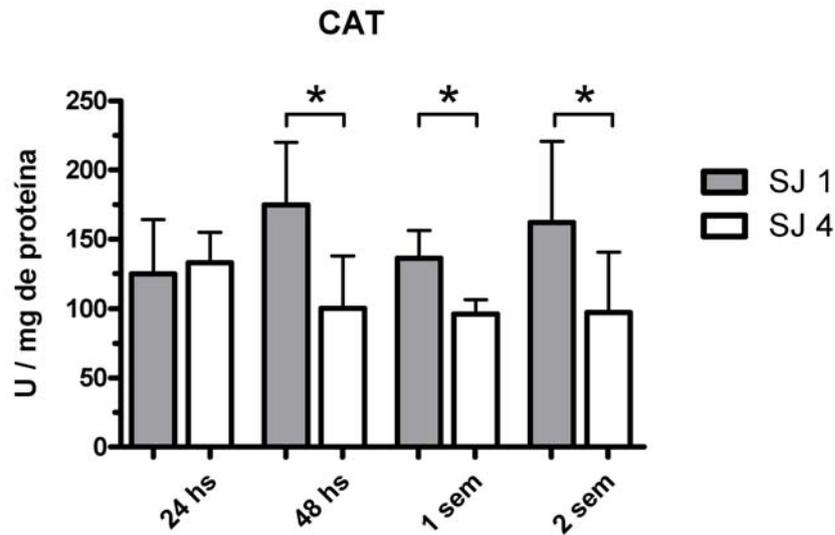


Figura 6. Experimento II: Análise temporal da atividade da enzima catalase (CAT) em brânquias de *C. rhizophorae* mantidas nos locais SJ1 (poluído) e SJ4 (referência) por 24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas. * indica diferença estatística entre os locais ($p < 0,05$).

Portanto, os resultados obtidos nos experimentos I e II indicam que o biomarcador bioquímico em *C. rhizophorae* que melhor indicou a presença de contaminação por esgoto doméstico no ambiente ou em ostras, foi a atividade da enzima CAT.

6.4.4. Identificação de novos genes biomarcadores de esgoto doméstico in situ utilizando a técnica de SSH

A fim de identificar possíveis genes biomarcadores moleculares de esgoto doméstico em ostras *C. rhizophorae*, foi utilizada a técnica de hibridização subtrativa supressiva comparando-se as populações de RNAm de ostras mantidas no local contaminado (SJ1) com ostras mantidas no local referência (SJ4). Amostras do experimento II foram utilizadas para as subtrações, uma vez que neste experimento foram coletadas amostras em diferentes tempos de exposição (24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas), o que possibilitaria uma análise posterior das respostas de expressão temporal para os novos genes identificados. Ao todo, foram realizadas duas subtrações, ambas comparando ostras coletadas no local SJ1 com o SJ4 do experimento II, porém com algumas diferenças, que foram sumarizadas na Tabela 8. Os produtos de cDNA não-subtraídos, obtidos nas subtrações 1 e 2, foram clonados. O número de colônias de bactérias contendo os insertos dos produtos das subtrações, que tiveram

plasmídios purificados e submetidos ao sequenciamento, e número de sequências válidas obtidas após o sequenciamento pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8. Características e resultados obtidos nas duas hibridizações subtrativas supressivas realizadas em *C. rhizophorae*.

	subtração 1	subtração 2
órgão analisado	brânquia	glând. dig.
tempo de exposição em campo	14 dias	24 hs
locais comparados	SJ1 x SJ4	SJ1 x SJ4
RNA _m inicial	1 ug	2 ug
duração da segunda hibridização	8 hs	6 hs
total de clones sequenciados	227	96
número de sequências válidas obtidas	119	87
<i>contigs</i> formados	17	16
Singletons	22	15
total de sequências submetidas a BLAST	39	31
total de sequências sem <i>match</i>	19	15
sequências com <i>match</i> significativo	20	16

Aproximadamente 50% das sequências submetidas a tBLASTx (36 sequências), apresentaram similaridade para sequências previamente depositadas no GenBank. Dentre estas, foi possível identificar funções putativas para 32 novos genes em *C. rhizophorae*. Além destes, foi identificada uma sequência mitocondrial na subtração 1 (28 % do total de clones) e um gene mitocondrial de RNA ribossomal *16S* em ambas as subtrações (previamente identificado em *C. rhizophorae*). Os genes identificados nas duas subtrações e anotados de forma preliminar utilizando-se a ferramenta tBLASTx do NCBI, foram agrupados segundo suas funções nas Tabelas 9 e 10.

Na subtração 1 foi identificado um contig de 1141 pb com uma alta similaridade ao gene anotado no GenBank como desidrogenase de cadeia curta (*SDR*), contendo a janela de leitura completa de 780 pb. Foi observada uma alta similaridade para várias espécies de vertebrados e invertebrados, porém não foi observada nenhuma sequência de molusco bivalve similar anotada no GenBank. Apesar disso sequências muito similares, porém não anotadas, foram encontradas em bancos de ESTs de *C. gigas* e *C. virginica* (dados não mostrados).

Uma sequência similar a um gene de *C. gigas* anotado no GenBank como cavortina foi encontrado (Tabela 9). Porém, tal sequência também mostrou similaridade semelhante, ou superior, a

genes de moluscos bivalves que receberam outras denominações, ex.: precursor de dominina em *C. virginica* (AB269930; identidade 98%; e-value 3e-62); superoxide dismutase em *C. gigas* (DQ010420; identidade 90%; e-value 2e-40); superoxide dismutase extracelular em *Saccostrea glomerata* (FJ626709; identidade de 85%; e-value de 6e-36) e precursor de pernina em *Perna canaliculus* (AF273766; identidade de 50%, 7e-11) (dados não mostrados). Dentre os genes estruturais do citoesqueleto, foram encontradas duas sequências similares a tubulina alfa e duas sequências similares a tubulina beta.

Tabela 9. Genes identificados como induzidos nas brânquias de *C. rhizophorae* expostas a efluentes contendo esgoto doméstico (Subtração 1). Populações de cDNA de ostras do local poluído (SJ1) foram hibridizados com cDNA de ostras do local referência (sentido forward) que haviam sido mantidas por duas semanas nestes locais.

classificação preliminar	gene similar (espécie - acesso)	BLASTe-value	tamanho da sequência (pb)	número de sequências
oxido-redutase (4 %)				
desidrogenase de cadeia curta	<i>Aedes aegypti</i> - XM_001657538	4E-86	1141	3
ligantes de metais (6,7 %)				
ferritina	<i>Crassostrea gigas</i> - CAD91440	4E-70	701	4
cavortina	<i>Crassostrea gigas</i> - AY551094	6E-43	400	1
estrutura e citoesqueleto (14,7%)				
tubulina alfa	<i>Equus caballus</i> - XP_001496291.2	4E-90	677	2
tubulin alfa	<i>Hyriopsis cumingii</i> - EF492566	2E-16	517	2
tubulina beta	<i>Crassostrea ariakensis</i> - DQ437571	2E-24	889	3
tubulina beta	<i>Saccostrea kegaki</i> - BAG55008	5E-55	542	3
actina	<i>Crassostrea virginica</i> - X75894	4E-76	392	1
cadeia respiratória (6,7%)				
NADH desidrogenase subunidade 2	<i>Crassostrea virginica</i> - YP_254654	3E-11	1022	1
citocromo b	<i>Crassostrea virginica</i> - YP_254651	5E-19	488	2
citocromo oxidase c subunidade II	<i>Crassostrea virginica</i> - YP_254652	2E-18	737	2
proteínas e RNA ribossomais (40 %)				
proteína ribossomal I17	<i>Haliotis discus discus</i> - ABO26685	1E-30	898	1
proteína ribossomal 40S	<i>Novocrania anomala</i> - ACD65103	4E-47	421	1
proteína ribossomal rpl13	<i>Lineus viridis</i> - ABZ04227	5E-25	407	1
proteína ribossomal L7	<i>Crassostrea gigas</i> - AJ557884	1E-58	286	1
proteína ribossomal L19	<i>Crassostrea gigas</i> - AJ563476	8E-41	384	4
proteína ribossomal rpl36	<i>Arenicola marina</i> - EU124985	2E-23	242	1
proteína ribossomal 60S	<i>Bombyx mori</i> - AM260708	1E-16	365	6
RNA ribossomal 16S	<i>Crassostrea rhizophorae</i> - DQ839415	7E-104	952	15
desconhecido (28 %)				
mitocôndria, genoma completo	<i>Crassostrea virginica</i> - AY905542	4E-76	757	21

Tabela 10. Genes identificados como induzidos na glândula digestiva de *C. rhizophorae* expostas a efluentes contendo esgoto doméstico (Subtração 2). Populações de cDNA de ostras do local poluído (SJ1) foram hibridizados com cDNA de ostras do local referência (sentido forward) que haviam sido mantidas por 24 horas nestes locais.

classificação preliminar	gene similar (espécie - acesso)	BLAST e-value	tamanho da sequência (pb)	n. de sequências
oxido-redutase (4,8%)				
citocromo P450 família 4 (CYP4BK1)	<i>Cyphoma gibbosum</i> - EU546252	4E-61	705	3
ligantes de metais (1,6 %)				
ferritina	<i>Crassostrea gigas</i> - AY321299	1E-56	516	1
transporte (1,6 %)				
carreadora de soluto mitocondrial (SLC25A38)	<i>Mus musculus</i> - NM_144793	1E-22	301	1
diferenciação celular e resposta imune (30,6 %)				
timosina beta-4 (TMSB4)	<i>Pan troglodytes</i> - AY462140	6E-16	584	19
cadeia respiratória (17,7 %)				
ATP sintase mitocondrial, cadeia delta	<i>Tetraodon nigroviridis</i> - EF103388	4E-42	566	5
citocromo c oxidase, subunidade I	<i>Crassostrea virginica</i> - AAW69394	4E-83	777	1
citocromo c oxidase, subunidade I	<i>Crassostrea virginica</i> - AW69394	1E-64	812	1
citocromo c oxidase, subunidade III	<i>Crassostrea virginica</i> - AAW69395	1E-71	779	2
NADH desidrogenase, subunidade 4	<i>Crassostrea virginica</i> - AAW69400	5E-103	759	1
NADH desidrogenase, subunidade 5	<i>Crassostrea virginica</i> - AAW69401	2E-38	461	1
proteínas e RNA ribossomais (37,1 %)				
proteína ribossomal S27	<i>Crassostrea gigas</i> - AB199896	7E-62	517	14
proteína ribossomal S11	<i>Crassostrea gigas</i> - AJ563454	6E-33	188	1
RNA ribossomal 16S; mitocondrial	<i>Crassostrea rhizophorae</i> - DQ839415	7E-99	745	8
fator de alongação (4,8 %)				
fator de alongação 1 alfa (EF1-alpha)	<i>Epichloe festucae</i> - AB122066	1E-63	542	1
fator de alongação 1 gama (EF1-gama)	<i>Tribolium castaneum</i> - XM_001809706	6E-47	370	2
função desconhecida (1,6%)				
camada exterior da membrana vitelínica (VMO-I)	<i>Gallus gallus</i> - D26093	6E-20	653	1

Genes de proteínas ligantes a metais foram mais abundantes na subtração 1 (6,7 %) do que na subtração 2 (1,6 %) e foram representadas pela presença do gene da ferritina em ambas subtrações, e cavortina apenas na primeira subtração. Genes de proteínas do citoesqueleto (actinas e tubulinas) foram mais abundantes na subtração 1 (14%), enquanto o gene de uma proteína relacionada a diferenciação celular (timosina beta-4) foi mais abundante na subtração 2 (31%). Genes de proteínas da cadeia respiratória foram observados nas duas subtrações, porém com maior representatividade na segunda subtração (18 %) do que na primeira (7%) (Figura 7). Interessantemente, componentes distintos deste sistema foram observados nas duas subtrações (Tabelas 9 e 10).

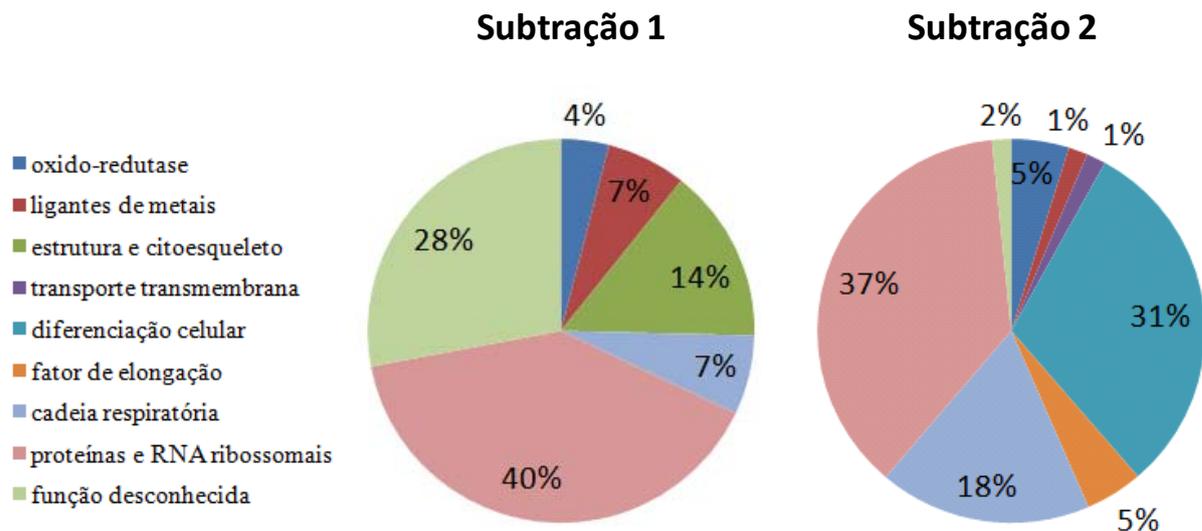


Figura 7. Proporção dos genes identificados nas duas subtrações em ostras *C. rhizophorae* agrupados segundo suas possíveis funções. Para maiores informações relativas as diferenças das subtrações 1 e 2 vide Tabela 8.

Os genes mais abundantes tanto na subtração 1, como na subtração 2, foram os genes que codificam proteínas ribossomais e RNA ribossomal *16S*. Estes genes foram colocados no mesmo grupo, pois ambos fazem parte da maquinaria celular de tradução. Apesar da porcentagem de ocorrência ser bastante similar para este grupo nas subtrações 1 e 2 (40 % e 37 %, respectivamente), genes de proteínas distintas foram identificados nas duas subtrações (ex.: *60S* e *L19* na primeira; *S27* e *S11* na segunda). Vários genes de função desconhecida foram observados na subtração 1, e representados por 21 cópias de uma sequência similar a uma parte do genoma mitocondrial de *C. virginica* (Tabela 9).

6.4.5. Identificação de novos genes biomarcadores em *C. rhizophorae* por PCR

Além da biblioteca subtrativa, foram utilizadas outras estratégias baseadas na técnica de PCR para a identificação de novos genes potenciais biomarcadores de contaminação aquática em *C. rhizophorae*. A primeira foi a utilização de iniciadores para amplificação gênica através da técnica de PCR desenhados, a priori, para sequências específicas da ostra *C. gigas* e obtidas a partir de um experimento prévio que identificou genes induzidos em ostras expostas ao esgoto doméstico em laboratório (MEDEIROS, 2008). A segunda estratégia compreendeu a utilização de iniciadores degenerados para amplificação do gene da *CAT* em *C. rhizophorae*. Este gene foi escolhido com base

nos resultados de biomarcadores bioquímicos obtidos na seção 5.4.3. (página 40), que mostram que esta enzima apresentou uma boa correlação com a contaminação por esgoto doméstico.

A identidade dos fragmentos dos genes *MXR* (399 bp), *CAT* (475 bp) e *ACT* (346 bp) amplificados por PCR em cDNA de *C. rhizophorae* foram confirmadas por BLAST no GenBank. Os fragmentos de *CYP356A1* e *GSTO* não puderam ser identificados devido a problemas na ligação deste fragmento com o vetor de clonagem, ou possivelmente devido ao pequeno número de cópias dos fragmentos amplificados. Ao contrário dos outros genes amplificados por PCR, *CYP356A1* e *GSTO* apresentaram bandas eletroforéticas bastante fracas e um número muito pequeno de colônias positivas transformadas. Não foram obtidos produtos de PCR com tamanho esperado para os genes *FABP* ou *ALAS*.

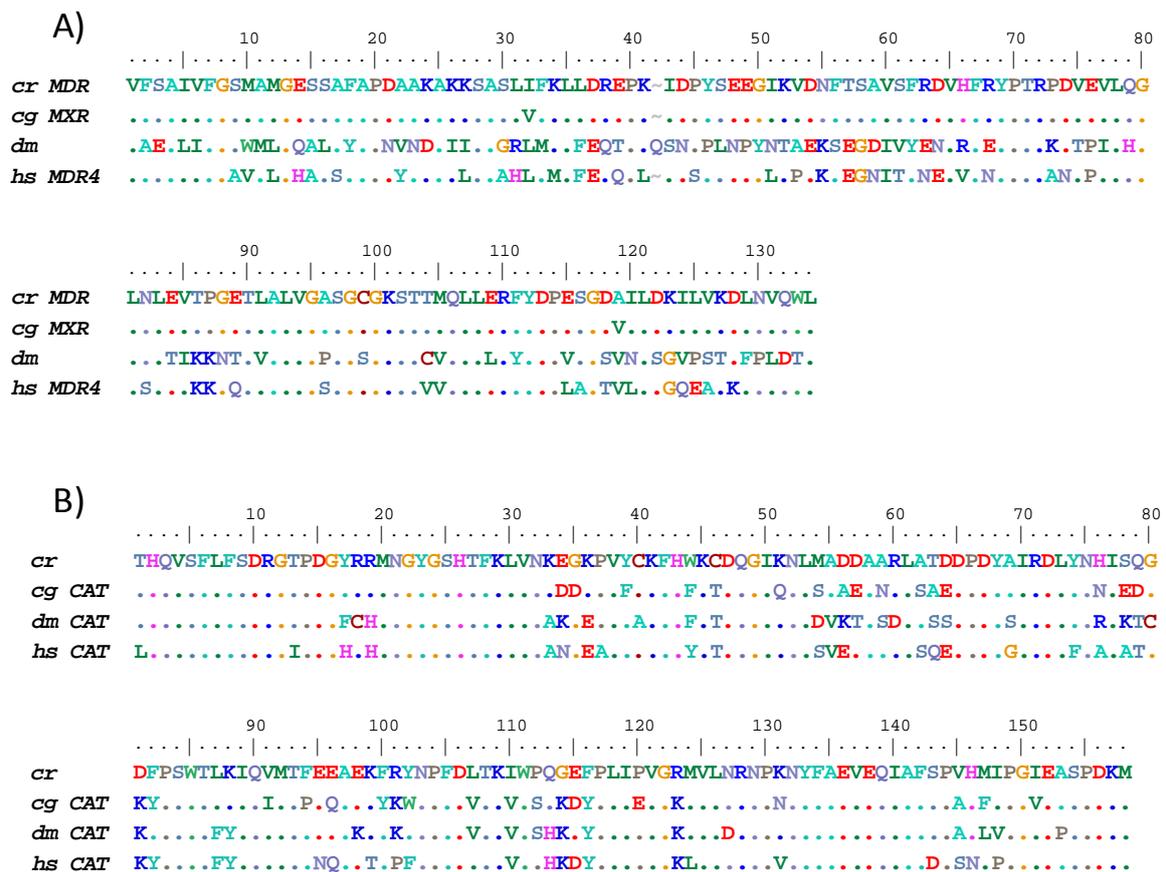


Figura 8. Sequência traduzida dos fragmentos clonados de *MXR* (A) e *CAT* (B) em *C. rhizophorae* (cr) e alinhamento destes fragmentos com sequências de ostra-do-pacífico (*C. gigas*; cg), mosca (*Drosophila mojavensis*; dm) e Humano (hs).

Sequências de *MXR*, *CAT* e *ACT* obtidas pra *C. rhizophorae* foram traduzidas para sequências de aminoácido e alinhadas com sequências das proteínas MDR (ou MXR), CAT (Figura 8) e ACT (não mostrado) de ostra *C. gigas*, mosca e humano. O alinhamento é mostrado na Figura 8. A identidade obtida a partir do alinhamento destas sequências é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11. Porcentagem de identidade entre as sequências proteicas de MXR, CAT e ACT traduzidas dos fragmentos de PCR amplificados em *C. rhizophorae* (cr) com sequências traduzidas de *C. gigas* (cg), *Drosophila mojavensis* (dm) e Humano (hs).

	cg	dm	hs
cr CAT	77%	75%	73%
cr MXR	98%	39%	64%
cr ACT	98%	96%	97%

6.4.6. Análise quantitativa de expressão gênica de *CAT*, *MDR*, ferritina e cavortina

A análise quantitativa da expressão de alguns dos genes identificados em *C. rhizophorae* foi avaliada em amostras de ostra do experimento II por PCR em tempo real. As análises para a expressão dos genes catalase (*CAT*), desidrogenase de cadeia curta (*SDR*), ferritina e cavortina em brânquias de ostras mantidas por 24 h, 48 h e 2 semanas nos locais de estudo SJ1 e SJ4, são mostrados na Figura 9. Não foram observadas diferenças de expressão gênica quando os grupos dos locais SJ1 e SJ4 foram comparados entre si (poluído e referência, respectivamente), em nenhum dos tempos de exposição. Porém, pode-se observar um aumento da expressão da *CAT* em ostras expostas por 2 semanas no local poluído, em relação às ostras mantidas no local referência por 24 h.

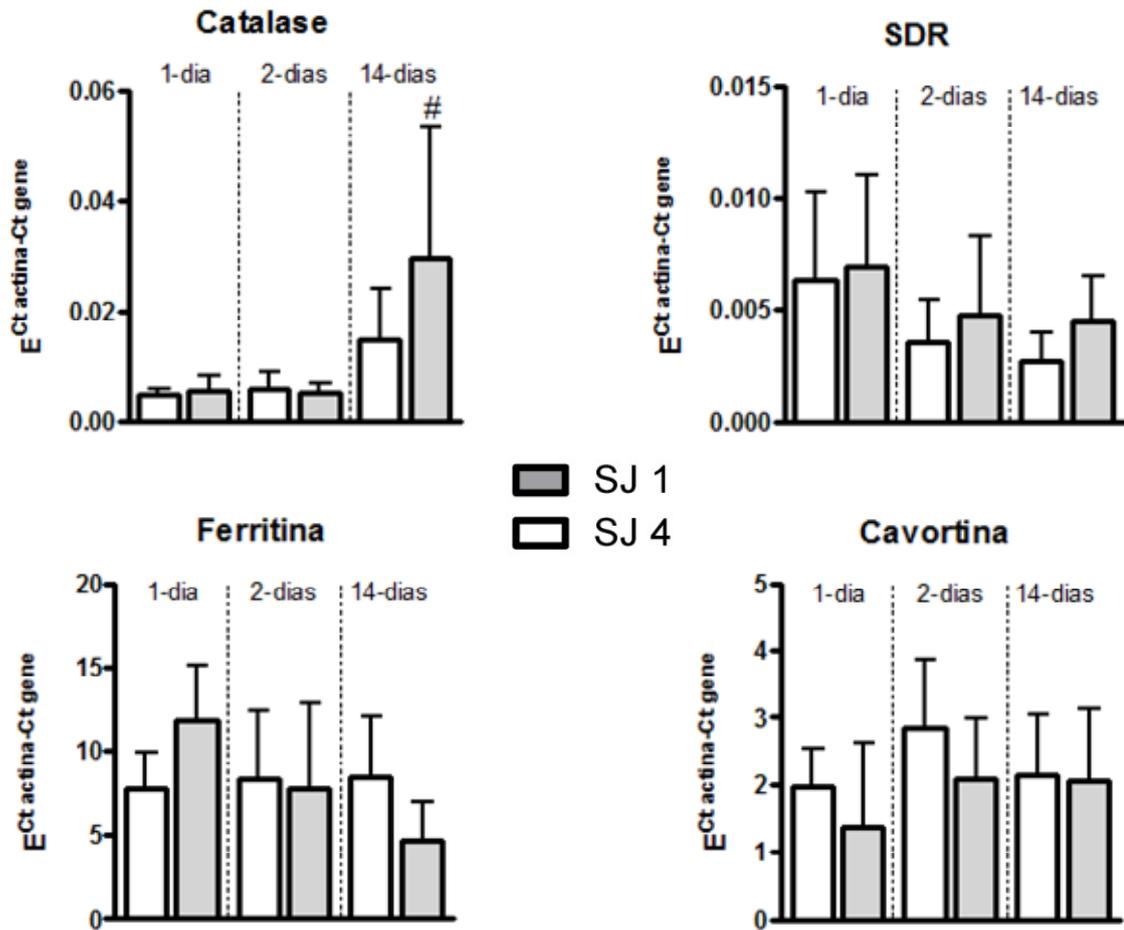


Figura 9. Expressão dos genes da catalase, desidrogenase de cadeia curta (*SDR*), ferritina e carvotina em amostras de brânquia de *C. rhizophorae* transplantadas para um local poluído por esgoto doméstico (SJ 1) ou um local não poluído (SJ 4) onde foram mantidas por 1, 2 e 14 dias. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os locais referência e poluído em um dado período de exposição. # indica diferença estatística em relação ao tempo de 24 h para um dado local (n=5 por grupo, Anova-Tukey post-hoc, $p < 0,05$, média \pm desvio padrão; n=4-5).

6.5. DISCUSSÃO

Ostras pertencem ao grupo Lofotrocozoa, que inclui moluscos e uma grande diversidade de outros grupos de invertebrados (ex.: sipúncula e anelídeos). Revisões recentes da árvore filogenética em metazoa utilizando ferramentas moleculares sugerem uma separação dos moluscos em um grupo monofilético irmão a um clado que inclui anelida, sipúncula, equiura, nemertina, foronida e braquiopoda (DUNN et al., 2008). Diferentemente de vários grupos de vertebrados e alguns grupos de invertebrados, que possuem espécies modelo com o genoma sequenciado completamente, bivalves são relativamente pouco estudados do ponto de vista genético (SAAVEDRA; BACHERE, 2006; JENNY et al., 2008). Portanto, a identificação e caracterização da expressão de novos genes em ostras, assim como em outros bivalves, representam um importante passo para uma melhor compreensão das respostas biológicas neste grupo de organismos, tão importantes do ponto de vista econômico, social e ambiental (SAAVEDRA; BACHERE, 2006).

No presente estudo, foram identificados novos genes na ostra-do-mangue *C. rhizophorae*, uma espécie que ocorre amplamente na costa Atlântica da América do Sul, incluindo grande parte da costa brasileira (BOFFI, 1979). Trata-se de uma espécie que serve como fonte de alimento e sustento de populações humanas (CARRANZA; DEFFEO; BECK, 2009), mas que também pode ocorrer em regiões estuarinas poluídas (DA SILVA et al., 2005), e portanto, se apresenta como um potencial modelo de molusco bivalve a ser caracterizado biologicamente ao nível molecular. Apesar da notável importância desta espécie de ostra, muito pouco se sabe a respeito de sequências gênicas nesta espécie. Em uma busca no GenBank, foram encontradas apenas 18 sequências para *C. rhizophorae*, sendo 10 delas, anotadas como RNA ribossomal *16S* ou proteína ribossomal (busca realizada no GenBank em 21/07/2009).

Os novos genes foram identificados em um estudo de campo, planejado com o intuito de transplantar ostras para um ambiente que sofre o impacto do lançamento de esgoto doméstico, e monitorar parâmetros bióticos e abióticos do ambiente em que as ostras foram mantidas. O esgoto doméstico é considerado uma das principais fontes de poluição marinha e estuarina no Brasil, uma vez que poucas cidades litorâneas brasileiras possuem coleta, tratamento e descarte adequados (MARTINS et al., 2008). Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água, e químicos e bioquímicos das

ostras, foram monitorados em conjunto com técnicas de biologia molecular. Em suma, a identificação destes novos genes poderá servir para futuros programas de biomonitoramento da contaminação ambiental aquática por esgoto doméstico, mas principalmente está aumentando o conhecimento básico requerido, e ainda escasso na literatura científica, para o estudo de respostas toxicológicas e mecanísticas de defesa para situações de estresse em moluscos bivalves.

6.5.1. Monitoramento dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos nos locais de estudo

Análises de coliformes e de parâmetros físicos e químicos que geralmente são alterados pelo despejo de efluentes domésticos, assim como análises de contaminantes químicos nas ostras, sugerem a presença de um gradiente de concentração de esgoto doméstico nos locais de estudo. Tal gradiente é marcado por maiores valores na desembocadura do Rio Bucheler (local escolhido como contaminado), e diminuição gradual da contaminação por esgoto em direção as proximidades da Pedra da Tipitingas (local escolhido como referência), o que possivelmente ocorre pela diluição deste esgoto à medida que os locais de estudo estão localizados mais afastados da principal fonte de contaminação.

Bactérias fecais são utilizadas em muitos países como ferramentas no monitoramento e servem como indicativo da presença de patógenos na água. Os coliformes fecais têm como principal origem fezes de mamíferos e aves (SAVICHTCHEVA; OKABE, 2007). No Brasil, órgãos ambientais (ex.: Resolução Conama Nº 357/2005; CONAMA, 2005) utilizam esse parâmetro como base para avaliação da viabilidade de cultivo de organismos aquáticos e balneabilidade e qualidade das águas. Apesar disso, algumas limitações deste método incluem a vida curta destes microorganismos em ambiente aquático, variação na taxa de mortalidade para parâmetros (ex.: radiação, salinidade e temperatura), origem não-fecal em alguns casos, e baixa sensibilidade dos métodos de detecção convencionais (HUGHES, 2003; SAVICHTCHEVA; OKABE, 2007). Portanto, a comparação dos níveis de coliformes medidos no presente trabalho, com níveis apresentados na literatura se torna difícil, e com pouco significado analítico. Porém, mesmo assim os níveis encontrados, principalmente para o local SJ1, estão bastante acima dos níveis considerados altos pela Resolução Conama Nº 357/2005 para água marinha, o que sugere fortemente a presença de altas concentrações de esgoto doméstico neste local.

Outros parâmetros físicos e químicos analisados na água, também sugerem a presença de contaminação por esgoto doméstico no local SJ1, como por exemplo, níveis mais altos de turbidez, amônia, nitrito e fosfato. De forma geral, a turbidez presente nos efluentes não-tratados é representada por material em suspensão provenientes da desintegração de fezes, papel, cascas de alimentos, e outros sólidos em suspensão coloidal (ARANA, 2004). Grande parte do material fecal presente na forma particulada é representada por polissacarídeos de origem vegetal não digeridos pelo homem (ARANA, 2004). Os níveis de amônia, nitrato e fosfato também foram mais altos nesse local. A principal fonte de amônia no esgoto doméstico provém da rápida hidrólização da uréia por microorganismos, uma vez que aproximadamente 75 % do nitrogênio que é excretado pelo ser humano está presente nesta forma (ARANA, 2004). A amônia, por sua vez, é convertida a nitrato por oxidação bacteriana (com consumo de oxigênio), o que explica as maiores concentrações encontradas deste nutriente. A oxidação da amônia e de carboidratos são os principais responsáveis pelo consumo de oxigênio em águas superficiais (ARANA, 2004), o que corrobora a maior demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e menor concentração de oxigênio dissolvido na água, observadas no local SJ1.

As análises químicas de alquilbenzenos lineares (LABs) em *C. rhizophorae* mostraram níveis distintos para os diferentes locais em que as ostras foram expostas, com maiores valores no local SJ1, e diminuição destes valores à medida que a localização das mini-balsas estava mais afastada deste local. Os LABs são moléculas orgânicas utilizadas na produção industrial dos detergentes comerciais alquilbenzenos sulfonatos (LASs), e também podem ser formados como produtos da degradação destes LASs (PENTEADO; SEOUD; CARVALHO, 2006). Existe um crescente interesse no uso destes compostos como marcador molecular da presença de esgoto doméstico (TSUTSUMI et al., 2002; PENTEADO; SEOUD; CARVALHO, 2006; MARTINS et al., 2008;) uma vez que os LABs indicam exclusivamente a presença de esgoto doméstico, e não de outros tipos de efluentes (ex.: industrial de processamento de comida e de indústria de papel) (JARDE; MANSUY; FAURE, 2005). Além disso, LABs possuem um caráter hidrofóbico, e são mais resistentes à degradação microbiana do que os LASs, sendo portanto, mais comuns no ambiente aquático e bioacumulados em moluscos bivalves (TSUTSUMI et al., 2002; ISOBE et al., 2007). Apesar de não haver estudos que mostrem algum efeito adverso em moluscos, ou qualquer outro animal, causados por LABs, a detecção de

LABs em ostra indica não apenas um gradiente da presença de esgoto doméstico no presente estudo (corroborando os outros parâmetros analisados em água), como também sugere que estes animais acumularam substâncias presentes no ambiente durante o período experimental. Em situações de estresse, moluscos bivalves podem impedir a entrada de contaminantes pelo fechamento das valvas e manutenção de suas atividades vitais por metabolismo anaeróbico (MOHAN et al., 1987), o que aparentemente não ocorreu no presente experimento. Esse é o primeiro estudo a utilizar a análise de LABs como marcadores da presença de esgoto doméstico em ostras *C. rhizophorae*, e poderão servir como importantes ferramentas para o monitoramento ambiental, como metodologia complementar as análises convencionais de monitoramento de esgoto doméstico na costa brasileira (ex.: coliformes fecais).

Análise químicas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilas policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados (OCs) e metais, realizadas nas ostras *C. rhizophorae*, sugerem que os níveis encontrados nas amostras não foram suficientes para classificação da área como de média ou alta poluição para estes compostos, se comparados a análises similares realizadas em outros estudos para PAHs (BAUMARD et al., 1998), PCBs (BENOLIEL, 1986), OCs (TANIGUCHI, 1995; USEPA, 1997) e metais (ISLA, 2000) em bivalves. Concentrações detectáveis (acima do limite de detecção) foram observadas para os contaminantes orgânicos específicos, como para os PAHs metilfenantreno (15,1 e 7,4 ng / g), fluoranteno (3,2 e 4,8 ng / g), pireno (4,6 e 4,1 ng / g), criseno (16,9 ng / g e <LDM); os PCBs PCB114 (1,7 ng / g e <LDM), PCB153 (1,35 ng / g e <LDM), PCB138 (<LDM e 1,3 ng / g); e os OCs DDE (4,8 ng / g e 5,15) e DDD (2,8 e 2,5 ng / g), apenas para o local SJ1 nos experimentos I e II respectivamente. Aldrin (2,21 ng / g) foi detectado no local SJ2 no experimento I, mas esteve abaixo do limite de detecção do método para os outros locais. Porém, é pouco provável que estes contaminantes, nas concentrações em que foram encontrados no local SJ1 ou SJ2, causem algum efeito nos biomarcadores bioquímicos e moleculares avaliados em bivalves no presente estudo, devido as suas baixas concentrações.

Resultados semelhantes, com baixas concentrações para metais, PCBs, OCs e PAHs, e altos valores de turbidez e amônia, são comuns em esgotos de outras regiões do Brasil (ABESSA et al., 2005). Novas substâncias presentes nos efluentes municipais vêm sendo consideradas “contaminantes

emergentes”. Dentre estas, estão medicamentos, produtos de cuidado pessoal (PPCPs) e desreguladores endócrinos (EDCs) que vem recebendo atenção quanto a regulamentação de seu descarte no ambiente (ex.: hidroxianisolo de butirato, bisfenol-A, ftalato, triclosan, nonilfenol, estrona, estradiol e etinilestradiol) (BOLONG et al., 2009). A presença de contaminantes emergentes na região do presente estudo em níveis suficientes para causar efeitos adversos na biota aquática, não pode ser descartada.

Não foram observadas diferenças importantes nos parâmetros abióticos não relacionados diretamente ao esgoto doméstico, como salinidade, temperatura, pH e clorofila entre os locais. Tal ausência de variação nestes parâmetros apresentou-se como uma característica vantajosa para o modelo experimental de campo utilizado, que teve como pressuposto a avaliação de respostas de biomarcadores bioquímicos e moleculares para o esgoto doméstico com o mínimo de influência de fatores abióticos não-relacionados diretamente ao esgoto. Estudos sugerem que fatores abióticos, como disponibilidade de alimento, salinidade e temperatura podem influenciar tanto nas respostas bioquímicas de bivalves, como na biodisponibilidade de contaminantes no ambiente aquático (POWER; SHEEHAN, 1999; DA SILVA et al., 2005; PFEIFER; SCHIEDEK; DIPPNER, 2005; ALMEIDA et al., 2007; LIMA et al., 2007). Outro cuidado tomado no presente estudo foi a utilização de um desenho experimental com transplante das ostras da mesma população (mesmo lote no cultivo do LMM, no caso), ao invés de coletas de animais do próprio ambiente. Tal estratégia vem sendo recomendada em vários estudos (ex.: BOCCHETTI et al., 2008, GORBI et al., 2008) a fim de minimizar possíveis diferenças em parâmetros bióticos, como por exemplo, diferenças genéticas populacionais, estágio reprodutivo, que poderiam afetar as respostas dos biomarcadores (LIVINGSTONE, 1984).

6.5.2. Avaliação do uso de biomarcadores de esgoto doméstico em *C. rhizophorae*

Apesar das dificuldades encontradas no uso e interpretação das respostas de biomarcadores bioquímicos em bivalves, no presente estudo foram encontradas respostas significativas na atividade da enzima catalase (CAT) em um experimento de transplante de ostras *C. rhizophorae* para um local contaminado por esgoto doméstico. Tais respostas foram observadas tanto no experimento I (gradiente

de contaminação), como no experimento II (diferentes tempos de exposição), e tanto em brânquia quanto em glândula digestiva.

A enzima CAT é considerada, juntamente com as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), como as principais enzimas antioxidantes celulares, e possui uma alta atividade catalítica em bivalves (ALMEIDA et al., 2007). Tais defesas tendem a aumentar frente à exposição a contaminantes, a fim de proteger os organismos contra uma possível situação de estresse oxidativo. CAT é uma enzima oxidoreductase que hidroliza peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), removendo então a toxicidade do peróxido (JO; CHOI; CHOI, 2008).

Em bivalves, a CAT é frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, e o aumento de sua atividade é associado com a exposição a vários contaminantes, como esgoto não tratado (BERGAYOU et al., 2009), pesticidas (ALVES et al., 2002), locais contaminados por efluentes urbanos (TORRES et al., 2002), hormônios e contaminantes desreguladores endócrinos (CANESI et al., 2008) e fármacos (benzafibrato e gemfibrozil; CANESI et al., 2007). Por outro lado, pouca ou nenhuma resposta desta enzima foram observados em animais expostos a PAHs (FROUIN et al., 2007; PICHAUD et al., 2008) e óleo diesel (DA SILVA et al., 2005).

Em complementação aos métodos utilizados para medição da atividade da CAT, seria também interessante utilizar outros métodos complementares de detecção da proteína CAT (ex.: *Western Blot* ou proteômica), a fim de garantir que a atividade medida represente a atividade da enzima, e não uma possível atividade não-específica para o H_2O_2 . Por exemplo, estudos sugerem que invertebrados (poliquetos) produzem muco com atividade CAT-like inclusive maior do que a medida no tecido deste animal (MORAES et al., 2006). Estes autores sugerem que a atividade antioxidante de polissacarídeos presentes no muco, e de bactérias que o colonizam, podem ter importante contribuição na atividade catalásica medida (MORAES et al., 2006). Apesar do presente estudo não ter avaliado a abundância/diversidade bacteriana em brânquia e glândula digestiva de *C. rhizophorae*, é provável que a comunidade microbiana presente nestes órgãos (ou no muco) em ostras submetidas ao esgoto seja diferenciada daquela observada em ostras que não foram submetidas a estas condições. No presente trabalho, uma carga muito maior de bactérias do grupo coliformes (tanto total quanto fecal) foi observada na água no local poluído, e uma forte correlação entre os coliformes fecais e a atividade

CAT foi observada tanto em brânquias como em glândulas digestivas. Estudos futuros poderão verificar a influência do muco e colônias bacterianas na atividade catalásica medida em brânquias e glândulas digestivas de ostras, a fim de verificar tanto a especificidade deste método amplamente utilizado para medição da atividade da CAT, bem como para a identificação de possíveis respostas adaptativas das ostras para locais contaminados por esgoto doméstico.

Interessantemente, um estudo paralelo do nosso grupo de pesquisa, com análises de atividade da enzima CAT em ostras de outra espécie (ostra do pacífico, *C. gigas*) não observaram nenhum aumento na atividade desta enzima tanto no experimento I como no experimento II, para a mesma região de estudo (NUNES, 2008; ZANETTE et al., 2008). Tais estudos indicam uma possível diferença entre estas espécies do mesmo gênero para a resposta ao esgoto doméstico. A importância biológica deste efeito espécie-específico deverá ser melhor investigada e poderá auxiliar na identificação de diferenças nos mecanismos de defesa ao estresse ambiental para essas duas espécies de importância econômica e social.

Apesar das respostas enzimáticas da CAT terem aumentado para o local poluído, não foi observado aumento ao nível de expressão gênica. Trabalhos anteriores mostram aumento na expressão gênica da CAT em organismos expostos a esgoto doméstico não tratado (CONTARDO-JARA; WIEGAND, 2008) e ao cobre (JO; CHOI; CHOI, 2008). A ausência de indução deste gene foi observada nos animais expostos ao SJ1 e SJ4 por 24 h, 48 h e 2 semanas de exposição. Apesar de não ter sido observada uma diferença na expressão deste gene nos animais de ambos locais, nos seus respectivos períodos de exposição, é importante destacar que existe um aumento significativo da expressão da CAT se comparamos as ostras mantidas por 2 semanas no local poluído, com as ostras mantidas no local referência por 24 h (Figura 9). Isto sugere que em termos biológicos, possivelmente, haja um aumento nesta expressão, mas que devido ao baixo número amostral não são observadas alterações significativas.

Outra hipótese é que a resposta regulatória observada na atividade da CAT esteja associada a outros processos, que não a indução por regulação gênica. Um dos mecanismos conhecidos de regulação pós-traducionais da atividade da CAT em células humanas e camundongos é a fosforilação dos resíduos de tirosina Y²³¹ e Y³²⁸, conferindo um aumento de até 5 vezes na atividade desta enzima

(CAO; LENG; KUFU, 2003; RHEE et al., 2005). Tal fosforilação é realizada pela família Abelson (Abl) de tirosina quinases não-receptoras, que consiste de c-Abl e Arg. A fosforilação se dá pela interação do motivo P²³⁹FNP da CAT com o dímero c-Abl / Arg, e é regulada pela concentração citosólica de H₂O₂. Na sequência CAT identificada para *C. rhizophorae* foi constatada a presença da Tyr²³¹ porém, o mesmo aminoácido não é observado na sequência de *C. gigas*. Estudos futuros poderão elucidar se esta diferença nos sítios de fosforilação das CAT de *C. rhizophorae* e *C. gigas* possuem alguma relação com as diferenças observadas na regulação da atividade da CAT para a exposição ao esgoto doméstico nestas duas espécies.

A atividade da enzima G6PDH aumentou nos animais mantidos no local poluído apenas em brânquia e apenas no experimento II. Tal enzima é um importante componente da via das pentose-fosfato, principal via de reciclagem de NADPH na célula. Estudos recentes mostram que a G6PDH possui um papel crítico no crescimento celular, particularmente, fornecendo NADPH necessário para a manutenção do estado redox da célula. Um dos mecanismos recentemente descrito de regulação da atividade desta enzima envolve a sua fosforilação reversível. A atuação deste mecanismo foi observada em gastrópode (*Otala lacteal*) em estado de dormência, ocasionando uma importante estratégia para o favorecimento das defesas antioxidantes pelo aumento da produção de NADPH neste estado (RAMNANAN; STOREY, 2006). O NADPH também é uma importante coenzima utilizada na transferência de elétrons para o sistema de biotransformação de xenobióticos de fase-I citocromo P450 (CYP).

Nenhuma alteração na resposta dos biomarcadores enzimáticos GR e GST foi observada. A GR participa da redução de glutatona oxidada (GSSG) utilizando NADPH como doador de elétrons, tendo importância crucial na manutenção dos baixos níveis de GSSG na célula, sendo uma importante parte do sistema antioxidante celular (STOREY, 1996). Em moluscos bivalves, estudos sugerem que a resposta da GR é bastante sensível para a poluição ambiental (BOCCHETTI et al., 2008; REGOLI; PRINCIPATO, 1995).

A GST é considerada uma enzima de biotransformação de contaminantes orgânicos e também uma enzima antioxidante. Estudos mostram uma correlação positiva da atividade da GST com a concentração de PAHs, benzo[a]pirenos (CHEUNG et al., 2001), bem como com PCBs e OCs

(CHEUNG et al., 2002), em tecidos de mexilhões. Wong e Lau (2003) também observaram maior atividade da GST em mexilhões *Perna viridis* provenientes de locais contaminados por poluição associada à ocupação urbana e fluxo de embarcações, quando comparados com aqueles oriundos de locais pouco povoados. Porém, o presente estudo sugere que o uso desta enzima como biomarcador ambiental de esgoto doméstico não-tratado *in situ*, pode ter aplicação limitada. A característica do efluente em questão, com possível ausência de níveis médios e altos de contaminantes metabolizados por esta enzima, como por exemplo PAHs e metais, pode ser a principal causa da resposta distinta em relação aos estudos que propõe esta enzima como um sensível biomarcador ambiental para a poluição.

6.5.3. Identificação de novos genes em *C. rhizophorae* com potencial aplicação para estudos ecotoxicológicos

Duas bibliotecas subrativas identificaram genes com expressão possivelmente induzida em ostras expostas ao local poluído SJ1, em relação ao local referência SJ4. Foram utilizadas amostras diferentes e particularidades técnicas, que resultaram na identificação de poucos genes repetidos nas duas subtrações (apenas ferritina e RNAr *16S*). Dentre as características distintas das bibliotecas 1 e 2 estão, respectivamente, os tempos de exposição das ostras em campo (2 semanas e 24 hs), órgãos utilizados (brânquia e glândula digestiva), quantidade de RNAm inicial (1 ug e 2 ug) e duração da segunda hibridização utilizada na técnica de SSH (8 hs e 6 hs). TANGUY et al. (2008) também observaram uma sobreposição de genes bastante baixa para duas bibliotecas subrativas utilizando a técnica de SSH utilizando o mexilhão *Mytilus edulis*, e atribuíram isso a diferenças na expressão gênica de dois órgãos diferentes.

Foi possível anotar putativamente um total de 34 sequências gênicas em *C. rhizophorae*. Algumas destas sequências foram anotadas pela primeira vez para o gênero *Crassostrea* (ex.: duas novas tubulinas), e outras ainda não anotadas em bivalves (ex.: *SDR*, carreadora de soluto mitocondrial, timosina beta-4, *VMO-I*).

Apesar de vários novos genes em *C. rhizophorae* serem identificados, e apontados como potenciais biomarcadores no presente trabalho, as discussões a respeito da regulação, função e importância toxicológica destes genes em bivalves ainda é de certa forma especulativa. A medida que

a regulação destes genes e a função das proteínas relacionadas em espécies de bivalves, forem melhor caracterizadas na literatura, será possível inferir com maior precisão sobre a real importância biológica destes novos genes e sua participação em mecanismos toxicológicos em bivalves.

Alguns genes têm sido identificados em bibliotecas subtrativas de bivalves. Dentre eles estão genes relacionados a proteínas da cadeia de transporte de elétrons (ex.: citocromo c, subunidades da NADH desidrogenase e ATP sintase) e ribossomais, que foram encontrados em proporções significativas nas subtrações e são frequentemente encontrados em bibliotecas subtrativas de bivalves independentemente do tipo de estresse ou desafio aplicado aos organismos (HUVET et al., 2004; MEISTERTZHEIM et al., 2007; TANGUY et al., 2008; ZAPATA et al., 2009). Interessantemente, as proteínas ribossomais e da cadeia de transporte de elétrons obtidos na subtração 1 e 2 foram distintas, apesar de que o significado disso permanece para ser elucidado. O gene da ferritina não foi tão frequente, mas também é comumente encontrado em bibliotecas subtrativas. A função desta proteína é classicamente associada à detoxificação, transporte e armazenamento do ferro, tendo um importante papel na homeostase celular deste metal. Porém, outros papéis não-clássicos são apontados para esta proteína, como na proliferação celular e biomineralização em bivalves (TANGUY et al., 2008). A ausência da indução da expressão gênica da ferritina, constatada pela análise de PCR em tempo real, reforça a idéia de que este gene foi identificado como um “falso positivo” na subtração, e possivelmente esse é também o caso de vários outros estudos que vem identificando este gene através desta técnica.

Uma sequência contendo a janela de leitura completa para codificar uma proteína de 249 aminoácidos foi identificada na subtração 1, e anotada preliminarmente como uma proteína homóloga as proteínas da superfamília das desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR). Membros desta superfamília são enzimas NAD(P)(H) dependentes que possuem importância fisiológica no metabolismo de hormônios esteróides, prostaglandinas, carboidratos e retinóides, assim como no metabolismo de xenobióticos, drogas e carcinógenos (ENDO et al., 2009). A sequência de SDR de *C. rhizophorae*, não apresentou similaridade para nenhuma sequência de molusco bivalve anotada no GeneBank. Porém foi encontrada uma EST do pectinídeo japonês *Mizuhopecten yessoensis* (GH735122) que apresentou uma sequência traduzida de 237 aminoácidos e identidade de 58 %,

sendo provavelmente, um gene homólogo ao encontrado em *C. rhizophorae*. Também foi observada uma alta identidade (54 %) com SDR de vertebrados, para *Oryctolagus cuniculus* (Coelho; BAB18777), *Bos taurus* (bovino; AAI12879), *Osmerus mordax* (peixe; ACO09521), o que sugere que a mesma proteína é bastante conservada no reino animal. Tais sequências de vertebrados são anotadas no GenBank, como desidrogenase/reductase (família SDR) membro 4 (*SHRS4*). Uma outra anotação para este mesmo gene é sugerida por Persson et al., (2009), como *SDR25C2*, em uma iniciativa de resolver problemas de nomenclatura frequentes para a superfamília SDR. Segundo o sistema de nomenclatura proposto por Persson et al. (2009), as SDRs possuem um total de 48 famílias em humanos, com mais de 70 membros.

De acordo com Endo et al. (2009) *SHRS4* também é frequentemente anotada para outros organismos como carbonil reductase tetrâmica peroxisomal e possui especificidade para substratos que incluem cetonas aromáticas, compostos alfa-dicarbonila e retinóides (ENDO et al., 2009). Endo et al. (2009) propõem que estas proteínas evoluíram em humanos devido a importância relacionada a hormônios esteróides (3-beta-hidroxiesteróide reductase), enquanto em mamíferos não-primatas maior especificidade para atividade retinóica. Em ostras, e em outros invertebrados, a função desta proteína ainda não é conhecida, porém é possível que esteja envolvida no metabolismo de hormônios esteróides, ácido retinóico, ou xenobióticos (não abordados nos estudos citados), e portanto podem apresentar importância ainda não conhecida para estudos toxicológicos em moluscos bivalves, assim como outros processos fisiológicos.

Uma sequência similar ao gene cavortina de *C. gigas* foi encontrado na subtração 1. Porém, uma pesquisa mais apurada mostrou que sequências de bivalves com alta similaridade a esta também estão anotadas com outros nomes no GenBank, ex.: precursor de dominina em *C. virginica* (AB269930); superóxido dismutase em *C. gigas* (DQ010420); superóxido dismutase extracelular em *Saccostrea glomerata* (FJ626709) e precursor de pernina em *Perna canaliculus* (AF273766). Apesar destes genes terem sido anotados com nomes diferentes, trabalhos publicados com algumas destas sequências relatam características semelhantes para as proteínas codificadas, como por exemplo, serem as proteínas mais abundantes em hemolinfa de bivalves, possuírem pontes dissulfeto intramoleculares e formarem grandes aglomerados protéicos com centenas de unidades (SCOTTI et

al., 2001; GONZALEZ et al., 2005; SCOTTI; DEARING; GREENWOOD, 2007). Green et al. (2009), após uma comparação filogenética destas sequências sugere que cavortina e superóxido dismutase extracelular são a mesma proteína. Da mesma forma, Green et al. (2009) constatam que outra sequência do pectínideo *Argopecten irradians* (BAO et al., 2009), e perna do mexilhão *Perna canaliculus* (SCOTTI et al., 2001), representam sequências homólogas a essa proteína. Tanto no trabalho de Green et al. (2009), como no presente estudo, foi adotado o nome cavortina para essa proteína.

A alta similaridade da sequência de cavortina de *C. rhizophorae* com as cavortinas de outras espécies, sugere que ela possivelmente possui sua função conservada. Porém, a função desta proteína ainda é discutida entre diferentes autores (GREEN et al., 2009). Gonzales et al. (2005) argumentam que a cavortina está envolvida na imunidade, uma vez que contém sítios de reconhecimento para lipopolissacarídeos (LPS), além de atividade SOD. Por outro lado, Scotti et al. (2001 e 2007) não detectaram atividade SOD, e propõem que a função biológica desta proteína evoluiu para uma proteína chaperona ligante de metais. Green et al. (2009), também sugerem que a mesma não possui atividade SOD. Apesar da ausência de atividade SOD, é bastante provável que a cavortina tenha um importante papel na resposta imune. O gene da cavortina é quantitativamente mais expresso em populações de *C. gigas* resistentes a mortalidade de verão (HUVET et al., 2004), em *C. virginica* infectada com o protozoário *Perkinsus marinus* (TANGUY et al., 2004) e em pectínídeos infectados com a bactéria *Vibrio anguillarum* (BAO et al., 2009). Portanto, o possível aumento na expressão da cavortina, observado em brânquias de *C. rhizophorae*, pode representar um importante mecanismo de defesa para a alta carga bacteriana presente no local contaminado por esgoto doméstico.

Uma sequência similar a proteína de camada externa da membrana vitelínica em ave (VMO-I), foi encontrada na subtração realizada em glândula digestiva de ostra. Em aves, esta proteína está localizada na camada externa da membrana vitelínica do ovo, que por sua vez, difere da camada da membrana interna em vários aspectos, ex.: morfologia, composição química e origem. Aparentemente estas proteínas não são importantes para manutenção da estrutura física na membrana vitelínica. Trabalhos sugerem que a VMO-I pode sintetizar polissacarídeos (n=14, 15) a partir de hexasacarídeo, o que representa atividade similar a transferase de lisozima, porém sem atividade de hidrólise. Além

disso, existem semelhanças estruturais e funcionais (afinidade por ligar-se a células epiteliais) com a proteína delta-endotoxina, subunidade II, de *Bacillus thuringiensis*, o que sugere origens evolutivas semelhantes (SHIMIZU et al., 1994). Sequências similares vêm sendo encontradas em outros grupos de vertebrados, como por exemplo, mamíferos, peixes e anfíbios, porém as funções desta proteína nestes organismos permanecem para serem elucidadas. Em uma busca em bancos de ESTs de moluscos, foram encontradas três sequências com alto grau de similaridade em *C. virginica* (e-value de 0 a $6e^{-131}$, dados não mostrados), obtida de uma biblioteca subtrativa feita a partir de amostras de glândula digestiva, assim como no presente trabalho. Este é o primeiro estudo a mostrar a presença de um homólogo da proteína VMO-I em uma espécie de molusco.

Uma proteína ainda sem registro para moluscos bivalves, e preliminarmente anotada no presente estudo como *SLC25A38-like*, foi encontrada na subtração 2, como possivelmente induzida pelo esgoto doméstico em glândula digestiva de *C. rhizophorae*. As proteínas mitocondriais carreadoras de soluto (MCs) são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial interna. Em humanos, as MCs são transcritas pelos genes da família *SLC25* e possuem uma variedade de isoformas com diferentes especificidades para os metabólitos que transportam (PALMIERI, 2004). Além da função de transporte, algumas MCs têm um importante papel na regulação e manutenção do equilíbrio de potencial redox e de fosforilação entre o citosol e a matrix mitocondrial (PALMIERI, 2004). De acordo com Palmieri (2004) 23 membros desta família foram caracterizados ao nível funcional de um total de 29 sequências conhecidas. Novos membros desta família foram identificados em bibliotecas de ESTs (portanto não se tratam de pseudogenes) no genoma humano (HAITINA et al., 2006).

No presente trabalho foi identificada uma sequência *SLC25A38-like* em *C. rhizophorae*. A isoforma *SLC25A38* foi recentemente descoberta e descrita em humanos (HAITINA et al., 2006) e posteriormente identificada de forma putativa em outros vertebrados (GenBank). A função de *SLC25A38* em humanos ainda é pouco conhecida, mas sua identidade com outras sequências ao nível de aminoácido sugere que ela é relativamente diferente dos outros membros da família *SLC25* (23% e 27 %, em relação aos membros 25A1 e 25A30, respectivamente) e que possui um ortólogo em levedura (33%) com os mesmos resíduos na região de reconhecimento de substrato (HAITINA et al.,

2006). Recentemente, importantes funções fisiológicas em humanos têm sido associadas ao gene *SLC25A38*, uma vez que mutações específicas levaram a incidência da doença anemia sideroblástica em humanos e foi demonstrado que a proteína SLC25A38 é importante para a síntese de grupamentos heme em eucariotos (GUERNSEY et al., 2009).

A sequência traduzida do fragmento de *C. rhizophorae* obtida no presente trabalho apresentou 53 % de identidade com a SLC25A38 humana, o que sugere uma possível inserção deste gene de ostra na mesma família SLC25A38 de humanos (a ser confirmado por análises filogenéticas). Até onde se sabe, ainda não foi descrita em moluscos a existência de proteínas SLC25, apesar da existência de várias sequências de bivalves depositadas no GenBank com alto grau de similaridade com a sequência *SLC25A38-like*. Possivelmente isso se deve ao fato da descoberta deste gene ter ocorrido muito recentemente, mesmo em humanos. Em uma busca no GenBank utilizando a *SLC25A38-like* de *C. rhizophorae* foi encontrado pelo menos 14 ESTs que apresentaram altos valores de e-value (entre e^{-60} e e^{-20}) e identidade (90 %-54 %) com outros bivalves (ex.: CD650599.1, CV087914.1, ES789100, EW777657, CB617529 e CB415339). Dentre estas, estão sequências de bibliotecas normalizadas e subtrativas de ESTs em *C. virginica*, *C. gigas*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, submetidas a diferentes tipos de estresse e identificadas em diferentes tecidos (ex.: brânquia, músculo, glândula digestiva, hemócito) de organismos adultos, ou estágios iniciais do desenvolvimento larval. Devido à importância fisiológica dos membros da família SLC25A38, e a constatação da presença do membro SLC25A38-like em outras bibliotecas subtrativas de bivalves, é de se esperar que esta proteína também possua importância em processos fisiológicos em bivalves e possivelmente alguma regulação da expressão gênica relacionada com a presença de poluentes nestes invertebrados.

Outro fragmento identificado na biblioteca subtrativa de glândula digestiva apresentou similaridade com o gene timosina beta-4 (*TMSB4*). Timosinas são proteínas de baixo peso molecular envolvidas na resposta imune de vertebrados, diferenciação celular, regeneração de tecidos (MALINDA et al., 1999) e possivelmente na diferenciação de hemócitos em ostras (JENNY et al., 2002). O gene timosina b4-like já foi previamente anotado em bibliotecas de *C. virginica*, e apontado dentre outros genes identificados em hemócitos, como um potencial biomarcador de estresse em ostras (JENNY et al., 2002). Interessantemente, a grande maioria das sequências identificadas nesta

biblioteca subtrativa (30,6 %) foram representadas por *TMSB4-like*. Portanto, o possível aumento na expressão da *TMSB4-like*, observado em glândula digestiva de *C. rhizophorae*, pode representar um importante mecanismo de defesa para a alta carga bacteriana presente no local contaminado por esgoto doméstico.

Dentre os genes estruturais do citoesqueleto, encontrados na subtração 1, estão duas sequências de tubulina alfa e duas sequências de tubulina beta. A princípio, pensou-se que estes pares de sequências poderiam se tratar de ESTs similares a genes únicos, uma vez que apenas uma tubulina alfa e uma tubulina beta em *C. gigas* estão anotadas no GenBank. Porém pesquisas em bancos de ESTs de bivalves deram suporte para a anotação preliminar destas sequências como novos genes similares a tubulinas (dados não mostrados). Portanto o presente estudo sugere que existam mais de uma tubulina da família alfa e mais de uma tubulina da família beta em *C. rhizophorae*, e possivelmente em outros bivalves. Estudos filogenéticos com estas novas sequências de ESTs, e sequências de ESTs já presentes no GenBank, similares a tubulinas, poderão confirmar tal afirmação.

Foi identificada uma sequência de *CYP4-like* na subtração 2. Os citocromos P450 (CYP) representam uma superfamília de genes que codificam proteínas de membrana com uma ampla diversidade de substratos e que catalizam uma miríade de reações, incluindo detoxificação de drogas e metabolismo de moléculas endógenas. É sabido que este grupo está implicado em processos vitais importantes em mamíferos e que mutações nos genes CYP estão associadas a doenças em humanos (NEBERT; RUSSEL, 2002). Os CYPs são representados por 57 isoformas em humanos, e possivelmente, uma diversidade semelhante ou maior de isoformas na maioria dos grupos invertebrados (BALDWIN; MARKO; NELSON, 2009). CYP4 em vertebrados estão relacionados com a metabolização de ácidos graxos, eicosanóides e ácido araquidônico, e tem sua expressão gênica induzida por indutores de proliferação peroxisomal (ex.: dietilhexaftalato, DEHP) (NEBERT; RUSSEL, 2002). Em artrópodes, uma grande diversidade de membros da família 4 é observada (49 % do total de CYPs em *Daphnia pulex*) e é sugerido que estejam envolvidas no controle hormonal, sensorial, interação planta-hospedeiro, biotransformação de pesticidas, dentre outros (BALDWIN; MARKO; NELSON, 2009).

A função de membros da família CYP4 em moluscos é desconhecida, porém quanto a sua diversidade de isoformas, sugere-se que seja menor do que a observada em artrópodes, e foram identificados cinco sequências não redundantes, pertencentes a esta família, no molusco bivalve *Mytilus californianus* após pesquisa em uma biblioteca de ESTs depositada no GenBank (Capítulo 2 do presente trabalho, manuscrito submetido para publicação). Entretanto, diferentemente do observado em vertebrados, Chaty, Rodius e Vasseur (2004) sugerem que em moluscos bivalves a expressão gênica de *CYP4* (pelo menos da isoforma em estudo) não é induzida por um indutor clássico de proliferação peroxisomal (DEHP). A análise quantitativa da expressão deste gene nas amostras de *C. rhizophorae* utilizadas na subtração 2, será necessária para confirmar se este gene foi realmente induzido significativamente para o esgoto doméstico. Porém, independentemente do fato deste gene ter sido induzido ou não, a caracterização deste novo gene identificado mostra-se de grande importância para o estudo da família CYP4 em moluscos, e poderá revelar importantes funções relacionadas a detoxificação de contaminantes, e/ou possíveis funções endógenas relacionadas ao metabolismo de lipídeos.

Utilizando-se iniciadores degenerados foi possível identificar uma sequência similar ao gene da catalase (*CAT*) em *C. rhizophorae*. O alinhamento desta sequência (traduzida) com sequências de *CAT* de outros grupos (humano, drosófila e ostra-do-pacífico) demonstra uma alta identidade deste fragmento com sequências destes organismos (73 % - 77 %). Tal resultado vai ao encontro das análises realizadas por Jo, Choi e Choi (2008) que caracterizaram a sequência completa do gene de *C. gigas* e sua identidade com outros organismos, e sugere que a identidade e função desta enzima é altamente conservada no reino animal. Interessantemente, a identidade da sequência encontrada em *C. rhizophorae* com a sequência homóloga de *C. gigas*, mostra uma identidade não muito distinta do que aquela encontrada em relação a vertebrados tão distantes evolutivamente (ex.: humano e artópode). Curiosamente a atividade da *CAT* em *C. gigas* e *C. rhizophorae* responde diferentemente quando animais de ambas as espécies são expostos em um mesmo experimento de campo a efluentes contendo esgoto doméstico (ZANETTE et al., 2008), sugerindo que possíveis diferenças na sua regulação e/ou atividade catalítica possam existir.

Outro gene identificado em *C. rhizophorae* utilizando iniciadores não-específicos para esta espécie, codifica uma proteína da superfamília ABC, que é composta por glicoproteínas transmembrana de alto peso molecular, como por exemplo, as PgPs, MDRs e MRPs (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005). O mesmo gene já havia sido identificado e descrito anteriormente em *C. gigas* como um membro da classe I de MDR de mamíferos (gene de resistência a múltiplas drogas) na espécie de ostra *C. gigas* (MINIER et al., 2008) e também sugerido como induzido pela exposição ao esgoto doméstico (MEDEIROS, 2008). O fragmento identificado em *C. rhizophorae* traduzido apresentou uma alta identidade com MDR de *C. gigas* (98%), e curiosamente uma maior identidade com MDR de humano (64%) do que com MDR de mosca (39%). A alta identidade da sequência encontrada, com a sequência que codifica MDR em *C. gigas*, sugere que, a exemplo do que foi observado por Medeiros (2008) em *C. gigas*, MDR de *C. rhizophorae* também seja induzida por exposição ao esgoto doméstico. MDR, também denominado por alguns autores como MXR (proteína de resistência a múltiplos xenobióticos) é considerada uma linha de defesa geral para o estresse químico, pelo bombeamento transmembrana de uma ampla variedade de moléculas exógenas para fora das células (MINIER et al., 2002; MEDEIROS, 2008). A alta identidade desta sequência com MDR de humanos sugere que a mesma seja altamente conservada no reino animal, e que, portanto, deve possuir funções fisiológicas essenciais para o organismo, além da resistência a drogas. Porém, é necessária a realização de estudos mais aprofundados a respeito destas sequências, uma vez que existe uma enorme quantidade de genes da família ABC descritos tanto em vertebrados, como em invertebrados (ex.: 65 genes só em ouriço-do-mar) (GOLDSTONE et al., 2006), e portanto, é possível que outras sequências MDR existam em bivalves.

Em suma, um conjunto de vários novos genes foram identificados na ostra-do-mangue *C. rhizophorae* utilizando-se diferentes estratégias, e poderão ser caracterizados ao nível de expressão gênica em estudos futuros, para avaliação de sua aplicabilidade em estudos ecotoxicológicos utilizando esta espécie. Tal informação gerada para esta espécie representam um primeiro passo para uma caracterização posterior mais detalhada a respeito de suas funções, não apenas em *C. rhizophorae*, como em bivalves de uma forma geral, uma vez que muitos dos genes ainda não haviam sido descritos para este grupo animal.

6.5.4. Análise quantitativa de expressão gênica de *CAT*, *MDR*, ferritina e cavortina

A expressão de alguns dos genes identificados na subtração 1 (*SDR*, cavortina e ferritina) e identificados pelo uso de iniciadores degenerados (*CAT*), foram avaliados quantitativamente por PCR em tempo real em amostras de brânquia de ostras do experimento II.

Nenhum aumento na expressão gênica da *CAT* para o local SJ 1 (poluído) em relação ao SJ 4 (referência), foi observado apesar da atividade enzimática da *CAT* ter aumentado nestes animais. Trabalhos anteriores mostram aumento ao nível de expressão gênica da *CAT* em animais expostos ao esgoto doméstico não tratado (CONTARDO-JARA; WIEGAND, 2008) e ao cobre (JO; CHIU; CHIU, 2008). A ausência de indução deste gene foi observada nos tempos 24 h, 48 h e 2 semanas de exposição, porém é possível que o gene tenha sido induzido antes do período de 24 h, ou entre os intervalos das coletas, o que explicaria o aumento medido na atividade da enzima no local SJ 1. Apesar da ausência de diferença observada comparando-se os dois locais em um dado tempo de exposição, foi observado um aumento de expressão nas ostras expostas por 2 semanas em relação as ostras mantidas no local SJ4 por 24 h. Tal aumento no final do período de exposição pode estar relacionado a uma maior precipitação anterior a este período. No experimento II foram observados picos de precipitação nos dias 5 (52 mm) e 10 (60,8 mm). Tal condição, juntamente à maré vazante observada para o período de coleta de 2 semanas, pode ter colaborado para um aumento no fluxo de esgoto para os locais de experimento (NUNES, 2007) o que explicaria o aumento na expressão deste gene observado ao final do período de exposição para o local SJ 1.

A análise de expressão quantitativa dos genes identificados na subtração 1 (*SDR*, cavortina e ferritina) não apresentou diferenças entre os locais SJ1 (poluído) e SJ4 (referência). Para o tempo de exposição de duas semanas, as mesmas amostras de RNA total utilizados na subtração como material biológico inicial, foram utilizadas para a síntese de cDNA e avaliação da expressão gênica quantitativa. Porém, na subtração foram comparados dois pools (n=5 ostras) de RNAm, enquanto na análise de PCR em tempo real foram analisadas amostras de organismos individuais. É possível que a alta variabilidade individual na expressão destes genes em bivalves possa explicar tais resultados contraditórios comparando-se as duas técnicas. Tais diferenças de respostas, utilizando SSH e métodos quantitativos, também já foram observados em estudos similares utilizando moluscos bivalves (ex.:

BROWN et al., 2006; HUVET et., 2004). Portanto, o presente estudo ressalta a necessidade de validação dos resultados obtidos pela técnica de SSH, através da avaliação quantitativa da expressão dos genes detectados.

6.6. CONCLUSÕES

- Análises hidroquímicas e microbiológicas na água e análises químicas em ostras *C. rhizophorae* confirmaram a presença de um gradiente de contaminação por esgoto doméstico na área escolhida para o estudo na Baía Norte da Grande Florianópolis, SC. Ostras *C. rhizophorae* bioacumularam PCBs, PAHs, OCs e metais, porém estes contaminantes não foram encontrados em níveis suficientes para considerar a região altamente poluída por estas classes de substâncias. A análise de LABs em *C. rhizophorae* mostrou-se uma ferramenta promissora para o monitoramento da presença de esgoto doméstico em ambientes costeiros utilizando esta espécie como sentinela;
- Dentre os biomarcadores bioquímicos analisados em brânquia e glândula digestiva de *C. rhizophorae* (CAT, GST, G6PDH e GR) a atividade catalásica foi a que melhor indicou a presença de esgoto doméstico, por se correlacionar fortemente com níveis de coliformes fecais na água. Maior atividade da CAT nos animais do local contaminado foram observados a partir de 48 h de exposição e se mantiveram até o final do experimento (2 semanas);
- Um total de 36 novos genes possivelmente induzidos pelo esgoto doméstico *in situ* e de interesse para estudos ecotoxicológicos, foram identificados em *C. rhizophorae* a partir de uma biblioteca subtrativa supressiva (SSH). Dentre eles, estão genes possivelmente envolvidos no metabolismo de xenobióticos (*CYP4* e *SDR*), defesa imunológica (*TMSB4* e *cavortina*), ligante de metais (*ferritina* e *cavortina*), transporte de soluto mitocondrial (*SLC25A38*), citoesqueleto (*actina* e *tubulinas*) metabolismo energético (genes da cadeia respiratória), fatores de transcrição (*EF1s*), maquinaria de síntese protéica (genes ribossomais) e outros de função indefinida (ex.: *VMO-I*).

- Iniciadores não-específicos possibilitaram a amplificação por PCR de sequenciamento dos genes *CAT* e *MDR* em *C. rhizophorae*, envolvidos na defesa antioxidante celular e biotransformação de fase-III de xenobióticos, respectivamente.
- Estudos com PCR em tempo real mostraram que nenhuma alteração ocorreu na expressão dos genes *CAT*, *SDR*, cavortina e ferritina nas ostras expostas ao esgoto doméstico em campo. Outros estudos poderão confirmar possíveis aplicações para estes genes como biomarcadores de exposição ao esgoto doméstico, ao utilizar um maior tamanho amostral em campo, ou em exposições controladas destes animais em laboratório.

7. CAPÍTULO II

**Identificação de genes de citocromos P450 (CYP)
em moluscos bivalves e caracterização da expressão de novos
genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* no
mexilhão *Mytilus edulis*.**

7.1.INTRODUÇÃO

7.1.1. Características do bivalve *Mytilus edulis* (Linneus, 1758)

A sistemática do bivalve *M. edulis* está relacionada abaixo:

Superfilo	Lofotrocozoa
Filo	Mollusca
Classe	Bivalvia
Subclasse	Pteriomorpha
Ordem	Mytiloidea
Família	Mytilidae
Gênero	Mytilus
Espécie	<i>Mytilus edulis</i>



Figura 10. O mexilhão *Mytilus edulis*.

Mexilhões do gênero *Mytilus* constituem um importante elemento na ecologia de águas costeiras e são amplamente cultivados. Várias espécies da família Mytilidae estão distribuídas em praticamente todos os mares do mundo. Estima-se que a família Mytilidade teve origem na era Devoniana (aproximadamente 400 milhões de anos atrás) e a espécie *Mytilus edulis* (Figura 10) possui uma distribuição de latitudes temperadas do hemisfério Norte e Nova Zelândia, enquanto *Mytilus californianus*, também estudado no presente capítulo, possui uma distribuição na Costa do Pacífico na América do Norte (GOSLING, 1992). Os mitilídeos vêm sendo estabelecidos como os moluscos bivalves mais amplamente utilizados no monitoramento do impacto da poluição marinha. Dentre os programas que utilizam estes moluscos, podem ser citados o *Mussel Watch* nos EUA, MEDPOL e BIOMAR na Europa (DONDERO et al., 2006). No Brasil, a espécie *Perna perna*, que também pertence a família Mytilidae, representa uma espécie abundante no Sul e Sudeste da costa Brasileira, e

tem sido sugerida como uma potencial espécie sentinela e biomonitora para estudos costeiros (ALMEIDA et al., 2007; FRANCONI et al., 2007).

7.1.2. Citocromos P450 (CYPs) – uma superfamília

Os citocromos P450 (CYPs) compreendem uma das maiores e mais versáteis famílias de proteínas. CYPs são conhecidos por catalisarem reações de fase-I da biotransformação de uma variedade de xenobióticos lipofílicos, como por exemplo, fármacos, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e aloquímicos vegetais (NELSON et al., 1996). Por outro lado, muitos P450 possuem funções endógenas e se especializaram no metabolismo de moléculas sinalizadoras, como por exemplo, hormônios esteróides, eicosanóides e ferormônios. CYPs são compostos de aproximadamente 500 aminoácidos em sua estrutura primária, e regiões características que permitem uma identificação das enzimas pertencentes a esta superfamília (Figura 11) (REWITZ et al., 2006).

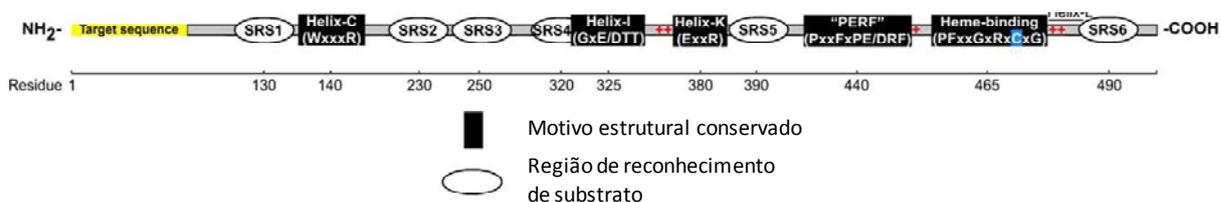


Figura 11. Representação esquemática de uma proteína CYP, mostrando motivos estruturais conservados (hélices e região de ligação do grupamento heme) e regiões variáveis de reconhecimento de substrato (SRS1-6). Números indicam a localização aproximada na sequência primária da proteína (adaptado de REWITZ et al., 2006).

Enzimas P450 catalisam uma variedade de reações, incluindo hidroxilação, epoxidação, desaminação oxidativa, desalquilação e desalogenização N-, O- e S-. A grande diversidade desta superfamília é um resultado de duplicações genômicas consecutivas e uma divergência subsequente de genes. Existem indícios de que os antigos P450 estavam envolvidos em importantes funções fisiológicas, ex.: síntese de esteróides. Mudanças ambientais e de estratégias de vida provavelmente direcionaram a diversificação funcional gerando uma ampla atividade para compostos exógenos. Enquanto as plantas desenvolveram novas moléculas protetoras (fitoalexinas), novos P450s foram recrutados para detoxificação destes compostos (REWITZ et al., 2006). Em humanos, os CYPs

compreendem 57 isoformas distribuídas em 18 famílias e 42 subfamílias (NEBERT; RUSSELL, 2002 (Tabela 12).

Tabela 12. Substratos e funções das famílias de genes CYP em humano (adaptado de NEBERT; RUSSELL, 2002).

família	nº de isoformas	substrato e função
CYP1	3	xenobióticos , ácido aracdônico, eicosanóides
CYP2	16	xenobióticos , ácido aracdônico, eicosanóides
CYP3	4	xenobióticos , ácido aracdônico, eicosanóides
CYP4	12	ácidos graxos, ácido aracdônico, eicosanóides
CYP5	1	síntese de tromboxano A ₂
CYP7	2	colesterol, síntese de ácido biliar
CYP8	2	síntese de prostaciclina, síntese de ácido biliar
CYP11	3	esteroidogênese
CYP17	1	esteróide 17 α -hidroxilase
CYP19	1	aromatase formadora de estrogênio
CYP20	1	desconhecido
CYP21	1	esteróide 21-hidroxilase
CYP24	1	vitamina D ₃ 24-hidroxilase
CYP26	3	hidroxilase de ácido retinóico
CYP27	3	síntese de ácido biliar, hidroxilase de vitamina D ₃
CYP39	1	24-hidroxicolesterol 7 α -hidroxilase
CYP46	1	colesterol 24-hidroxilase
CYP51	1	lanosterol 14 α -demetilase

Em invertebrados marinhos, genes P450 e evidências bioquímicas de atividade P450, têm sido demonstrados nos grupos Cnidaria, Annelidae (poliqueta), Mollusca, Artropoda (crustacea e insecta) e Equinodermata (REWITZ et al., 2006). Os níveis de citocromo P450 total e atividade monoxigenase têm sido estudados em bivalves por décadas (STEGEMAN 1985; LIVINGSTONE; KIRCHIN; WISEMAN, 1989). Muitos estudos também têm tentado detectar proteínas CYP1A, que são clássicos biomarcadores de exposição a contaminantes orgânicos. Contudo, a interpretação de muitos desses resultados em moluscos bivalves tem sido complicada por problemas metodológicos (vide detalhes na discussão deste capítulo). Assim, existe uma necessidade crítica de desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo de CYPs em bivalves. Nenhum genoma está disponível para moluscos bivalves até o presente momento, dificultando a identificação de CYPs nestas espécies de importância

ecológica e econômica ao nível genômico. Porém um número considerável de ESTs de ostra e mexilhão, está disponível no GenBank, e serviu de ponto de partida para a identificação e caracterização de novos CYPs em moluscos bivalves no presente estudo, em particular, para o mexilhão *Mytilus edulis*.

7.2. OBJETIVOS

- Identificar e classificar preliminarmente genes do sistema citocromo P450 (CYP) de moluscos bivalves (ostras e mexilhões) utilizando bibliotecas de EST disponíveis no GenBank;
- Identificar possíveis genes das famílias CYP1-, CYP3- e CYP26-like em mexilhão *Mytilus edulis*;
- Classificar filogeneticamente os genes das famílias CYP1-, CYP3- e CYP26-like identificados em *M. edulis*;
- Caracterizar a expressão órgão-específica dos genes CYP1-, CYP3- e CYP26-like em *M. edulis*;
- Verificar uma possível indução dos genes CYP1-, CYP3- e CYP26-like em *M. edulis* tratados com agonistas clássicos de receptor Ah em vertebrados.

7.3. MATERIAIS E MÉTODOS

7.3.1. Busca por CYPs em bancos de ESTs de bivalves

Primeiramente as ESTs disponíveis no GenBank para *M. californianus*, *M. galloprovincialis*, *C. gigas* e *C. virginica* foram obtidas. Em seguida os vetores e adaptadores foram removidos e alguns contigs foram contruídos utilizando o programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Sequências com homologia significativa para CYPs foram identificadas usando uma técnica baseada no modelo escondido de Markov (HMM - acrônimo do inglês *Hidden Markov Model*) implementada como função *ESTWise* de *GeneWise* (BIRNEY; CLAMP; DURBIN, 2004). *ESTWise* realiza uma busca sensível e acurada através da comparação de uma biblioteca de sequências de ESTs a um modelo escondido de Markov (ou biblioteca). Esta técnica é menos tendenciosa do que a técnica de BLAST em banco de dados de sequências (ex.: GenBank) o qual é negativamente influenciado por uma quantidade enormemente maior de sequências de vertebrados em relação a outros organismos. As sequências de *CYP* identificadas foram traduzidas, alinhadas usando Clustalw, e análises filogenéticas de máxima verossimilhança (do inglês *maximum likelihood phylogeny*) foram realizadas com um modelo de substituição de aminoácidos WAG usando RaxML (v 7.0.4) (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) utilizado para inferência de grandes árvores filogenéticas (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008).

7.3.2. Identificação e clonagem de novos genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em *M. edulis*

Amostras de glândula digestiva foram retiradas de mexilhões *M. edulis* coletados em Scorton Creek, Massachussets, EUA e escolhido aleatoriamente. RNA total foi isolado utilizando-se o kit AurumTM RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) o qual inclui eliminação de DNA genômico por tratamento com DNase. A qualidade e quantidade de DNA foram determinadas espectrofotometricamente (Nanodrop ND1000; NanoDrop Technologies). cDNA foi sintetizado a partir de 2µg de RNA, usando o Kit Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen Inc.), com a adição de iniciadores anchor oligo(dT) (MWG Biotech Inc.) e inibidor de Rnase (Promega Corp.). Iniciadores degenerados foram desenhados usando regiões conservadas de sequências *CYP1-like* do molusco

gastrópode *Lottia gigantea* e um contig obtido no banco de ESTs de *M. californianus* do GenBank similar a esta sequência. A sequência de *CYP1-like* do molusco *Lottia gigantea* foi obtida no genoma desta espécie, previamente anotada e gentilmente cedida pelo pesquisador do Instituto Oceanográfico de Woods Hole, Dr. Jared V. Goldstone. Pares de iniciadores específicos para um segundo gene *CYP1-like*, para dois genes *CYP3-like* e um gene *CYP26-like* foram desenhados com base nas sequências ou contigs de ESTs de *M. californianus* anotadas previamente no estudo filogenético descrito (vide seção 6.3.1.). O programa utilizado para as reações de PCR foi similar para todos os primers testados: 1 ciclo de denaturação inicial (30s; 90°C); 40 ciclos com denaturação (30s; 90°C), anelamento (45s; 40°C, 45°C, 50°C e 55°C), extensão (1min-72°C) e manutenção a 4°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose, purificados, ligados no vetor *pGEM-T Easy Vector* (Promega) e transformados em bactérias *E. coli* (TOP10 Kit, Invitrogen). Plasmídeos foram purificados de culturas de colônias positivas (QiaPrep, Qiagen) e sequenciados como descrito acima. Um par de iniciadores degenerados para uma sequência CYP1, anotada aqui como *CYP1-like* (a), que detectou o fragmento esperado é mostrado na Tabela 13. Outros pares de iniciadores específicos, desenhados com bases nas sequências de ESTs de *M. californianus* do estudo filogenético, e que amplificaram as sequências anotadas aqui como *CYP1-like* (b), *CYP3-like* (b), *CYP3-like* (c) e *CYP26-like*, também são mostrados na Tabela 13. As sequências obtidas foram traduzidas para o nível de aminoácido e preliminarmente anotadas utilizando BLAST e alinhamento com sequências CYP1 conhecidas de vertebrados.

As terminações 5' e 3' dos genes *CYP1-like* (a), *CYP1-like* (b) e *CYP3-like* (c) foram obtidas utilizando o kit BD SmartTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) a partir de RNA total de glândula digestiva de *M. edulis*. Os iniciadores específicos utilizados para amplificação destes genes são apresentados na Tabela 14 e foram desenhados levando-se em conta parâmetros recomendados pelo fabricante.

Tabela 13. Iniciadores utilizados na detecção de transcritos *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em *M. edulis*.

gene	iniciador	sequência 5' - 3'
me_CYP1 (a)	Senso	CCRWGRGGAWTTCCTATWYTTGG
	antisense	AKGGCATTACRAAWCGMARCCATGG
me_CYP1 (b)	Senso	TTGGGAAATACGAAAGCTACCTCCA
	antisense	TCCAGCAACAATGAAATCCCGTA
me_CYP3 (c)	Senso	TTCCTGGTCCGGAACCAACTCC
	antisense	GCAGACCTTAGCGCCGTGTGC
me_CYP3 (b)	Senso	CAAGGCTTCCAGTGTTCGGAGAAGG
	antisense	CACGTGGTCCAAGGCCAAAAGG
me_CYP26	Senso	TTGGGCAGGTCATCCCATCG
	antisense	TGCTTGGCCGGTTTTGACTGTG

Tabela 14. Iniciadores senso e antisense utilizados para amplificação das terminações 3' e 5', respectivamente, dos genes *CYP1-like* (a), *CYP1-like* (b) e *CYP3-like* (c) utilizando o kit BD SmartTM RACE.

gene	iniciador	Sequência 5' - 3'
CYP1 (a)	senso	GCAGAGAGGCAATACGTGAAGCGTTG
	senso (interno)	AACCCACTTCAGCCCCATGATGA
	antisense (interno)	GGCATAACAAATCGCAACCATGGCA
	antisense	GTTCCGGCGAATTTCCGTATTGTTCC
CYP1 (b)	senso	TGGGTAAGTGGCCGACCATAGTGC
	senso (interno)	AAATCACCAGCGTGAATGGTTGATG
	antisense (interno)	TTCCCCAACACAAGGCCTTTCA
	antisense	TCATGGTGAACCTTTTCTCGGCGTA
CYP3 (c)	senso	CCCAGGGAACACATTGGAAGTTTCT
	senso (interno)	GGAAAGAAAGCAGCCATTGGACAAC
	antisense (interno)	GTCTCCCCGCTGTGAGTGGATGTT
	antisense	CTTAGCGCCGTGTGCAAGAATTCAA

7.3.3. Análises filogenéticas de novos genes CYPs de *M. edulis* clonados

As sequências dos genes *CYP1-like* (a), *CYP1-like* (b), *CYP3-like* (a), *CYP3-like* (b), *CYP3-like* (c) e *CYP26-like* de *M. edulis* foram traduzidas e alinhadas com sequências *CYP* previamente identificadas em genomas de outras espécies. Dentre estas, estão os invertebrados *Lottia gigantea* (molusco, gastrópode), *Drosophila melanogaster* (inseto, artrópode), *Strongylocentrotus purpuratus* (equinodermo, ouriço-do-mar), e os vertebrados *Homo sapiens* e *Danio rerio* (humano e peixe-zebra).

Clustalw e análises filogenéticas de máxima verossimilhança (*maximum likelihood phylogeny*) foram realizadas com modelo de substituição de aminoácidos WAG usando RaxML (v 7.0.4) (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) utilizado para inferência de grandes árvores filogenéticas (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). As seqüências também foram submetidas a uma busca no GenBank assim como alinhadas com seqüências de CYP1, CYP3 e CYP26 de outros organismos para verificação da porcentagem de identidade, o que permitiu uma anotação preliminar dentro das famílias específicas.

7.3.4. Coleta, aclimação e experimento em laboratório com *M. edulis*

Mexilhões *M. edulis* de ambos os sexos (6-8 cm) foram coletados na praia de Scorton Creek, Massachussets, EUA em agosto de 2008 e setembro de 2008 para realização de dois experimentos, respectivamente. Em ambos os experimentos, mexilhões foram transferidos para o biotério aquático do Laboratório Redfield no Instituto Oceanográfico de Woods Hole, Massachusetts, USA (WHOI) onde permaneceram por um período de aclimação de uma semana, mantidos a 20 °C em água marinha corrente e alimentados duas vezes por dia com uma mistura de microalgas das espécies *Thalassiosira weissflogi*, *Tetraselmis chuil* e *Isochrysis sp.* gentilmente fornecidas pelo Marine Biological Laboratory, MBL, Woods Hole, MA, USA. No último dia de aclimação, um furo com abertura de aproximadamente 1,5 mm x 1,5 mm foi feito na junção das duas valvas de mexilhões na região proximal ao músculo adutor para posterior injeção de contaminantes ou veículo utilizados nos experimentos I e II.

No experimento I, mexilhões previamente aclimatados foram injetados com 100 µl dos agonistas do receptor AHR (Figura 12) aroclor 1254 (mistura de isômeros de PCB) e 6-formilindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) em músculo adutor nas doses aproximadas de 50 µg e 0,1 µg por grama de carne de mexilhão, respectivamente, ou com o mesmo volume de óleo vegetal (grupo controle). A dose de FICZ escolhida foi utilizada com base no trabalho de Mukai e Tischkau (2007), que demonstrou forte indução de *CYP1A1* em fígado de camundongos para concentrações de 1 a 100 ng de FICZ por grama de tecido. A dose de Aroclor 1254 foi utilizada com base no trabalho de Chaty, Rodius e Vasseur (2004). Todas as substâncias utilizadas foram diluídas no mesmo óleo vegetal

utilizado para injeção do grupo controle, (Pure Vegetable Oil, Crisco[®], J. M. Smucker Company, Orrville, OH, 44667, USA). Para o cálculo da dose, foi assumida uma massa de 16 gramas por mexilhão, baseada em biometria de cinco mexilhões coletados para o mesmo experimento (medindo 6-8 cm). O presente trabalho assumiu que os contaminantes, quando injetados no músculo adutor, são distribuídos pelos diferentes compartimentos do organismo. De fato, outros estudos têm adotado essa metodologia com sucesso, e observado efeitos causados, por exemplo, na glândula digestiva (Canesi et al., 2007).

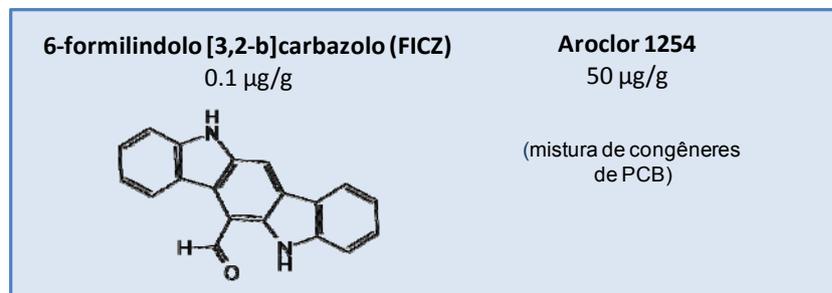


Figura 12. Substâncias agonistas do receptor AHR e as respectivas doses injetadas em *M. edulis* no experimento I.

Após a injeção, os mexilhões foram distribuídos em três aquários de 10 l com aeração constante, formando três grupos experimentais, aroclor 1254, FICZ ou óleo vegetal (controle), (n=7 mexilhões por aquário). *M. edulis* foram coletados 24 h após a injeção, e a glândula digestiva, brânquias, palpos labiais, músculo adutor, gônada, pé e margem do manto (Figura 13), foram dissecados do grupo controle. Glândulas digestivas foram dissecadas de mexilhões dos três grupos experimentais. As amostras biológicas foram conservadas, o RNA total extraído e o cDNA sintetizado (como descrito anteriormente) para posterior análise de expressão gênica quantitativa como descrito abaixo.

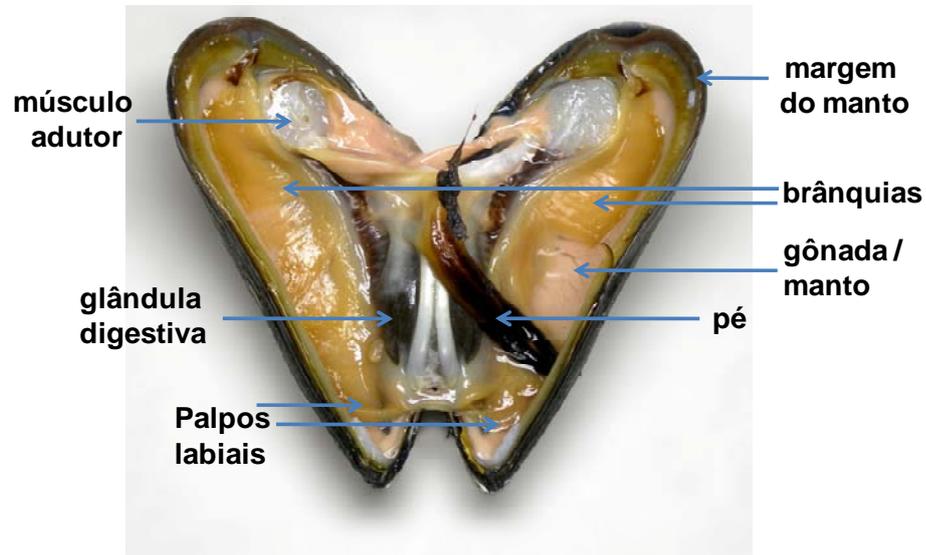


Figura 13. Órgãos do mexilhão *Mytilus edulis* coletados para as análises de expressão gênica nos experimentos I e II.

No experimento II, mexilhões (n=50) previamente aclimatados foram injetados com 100 μ l dos agonistas do receptor AHR (Figura 14) betanaftoflavona (BNF) e 3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB 126), nas doses de 25 μ g e 2 μ g por grama de carne, respectivamente, ou com o mesmo volume de óleo vegetal (grupo controle). O cálculo das doses utilizadas foi realizado conforme descrito anteriormente para o experimento I. Após a injeção, os mexilhões foram distribuídos em seis aquários de 10 l com aeração constante (n=8 mexilhões por aquário). Foram formando três grupos experimentais: controle, BNF e PCB 126, cada um desses grupos constituídos por dois aquários, e os mexilhões foram coletados 24 h após a injeção. A glândula digestiva e as brânquias foram retiradas (n=16 por grupo experimental), conservadas em RNA later, o RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado (como descrito anteriormente) para posterior análise de expressão gênica quantitativa como descrito abaixo.

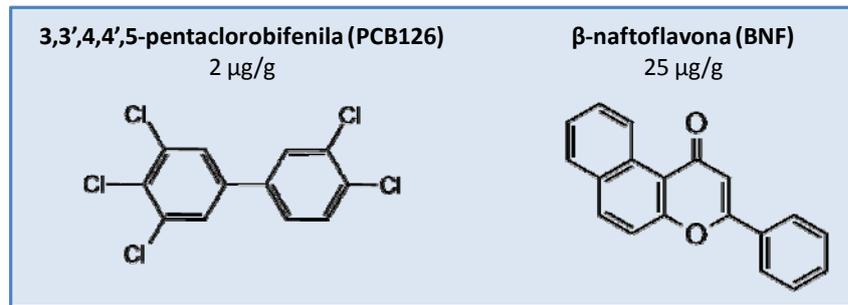


Figura 14. Substâncias agonistas do receptor AHR, e as respectivas doses injetadas em *M. edulis* no experimento II.

As doses para BNF e PCB126 e o tempo de exposição utilizadas tanto no experimento I como no experimento II foram escolhidas com base em estudos realizados em peixes que mostram que estas condições experimentais são suficientes para ocasionar a indução do gene *CYP1A* via ativação do receptor AHR para estas substâncias utilizadas (JONSSON et al., 2007).

7.3.5. Expressão gênica dos *CYP-like* em diferentes órgãos de *M. edulis* e indução por agonistas do receptor AHR.

Os iniciadores utilizados para análise de expressão dos genes *CYP1-like* de *M. edulis* são mostrados na Tabela 15, e foram desenhados com base nas sequências dos fragmentos de PCR obtidos para *CYP1-like_a*, *CYP1-like_b*, *CYP3-like_b*, *CYP3-like_c* e *CYP26-like* ou sequência depositada no GenBank (*CYP3-like_a*). Três sequências do gene normalizador *28S* (número de acesso AF120587, Z29550 e AF339512) de *M. edulis* foram obtidas no GenBank, alinhadas, e primers específicos foram desenhados evitando-se regiões polimórficas nesta espécie para este gene (Tabela 15). Níveis de expressão gênica foram calculados para cada gene usando curvas padrão geradas de diluições (10^2 a 10^9 moléculas) de plasmídeo (pGEM-T Easy Vector) contendo fragmentos de um dado gene alvo e a abundância de transcritos *CYP1* foi determinada por quantidade específica de RNA total para cada grupo utilizando *28S* apenas como um controle de eficiência para normalizar amostras individuais dentro de cada grupo, mas não entre órgãos diferentes.

Tabela 15. Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real para análise da expressão gênica de *CYP1-like (a)*, *CYP1-like (b)*, *CYP3-like (a)*, *CYP3-like (b)*, *CYP3-like (c)*, *CYP26-like* e *28S* de *M. edulis*.

gene	iniciador	sequência 5' - 3'
CYP1-like (a)	senso	TGGTTGCGATTTGTTATGCCCTGGA
	antisenso	GGCGGAAAGCAATCCATCCGTGA
CYP1-like (b)	senso	TGGGTAAGTGGCCGACCATAGTGC
	antisenso	TTCCCCAAACACAAGGCCTTTCA
CYP3-like (a)	senso	GGAGGATTGATGAGTTGGGAGGAC
	antisenso	AGGCGGCAAAGAAAGAGTGGTC
CYP3-like (b)	senso	TCAGTGCAATTGTCGTCGAAAAGC
	antisenso	TCATGGCGAGCGTTTAAACATCAG
CYP3-like (c)	senso	CCCAGGGAACACATTGGAAGTTTCT
	antisenso	GTCTCCCCGCTGTGAGTGGATGTT
CYP26-like	senso	GACTGTGACGATGAAATGGGAAACG
	antisenso	GTCCAAATCCAGGCAACTCAATCG
28S	senso	CTGGCCTTCACTTTCATTGTGCC
	antisenso	GACCCGTCTTGAAACACGGACCA

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Busca por CYPs em bancos de ESTs de bivalves

Várias sequências independentes ou contigs similares a CYPs foram identificados em banco de dados de ESTs utilizando uma técnica baseada no modelo escondido de Markov (HMM) implementada como função *ESTWise* de *GeneWise*. O número de sequências encontradas foi de 58, 12, 39 e 14 para *M. californianus*, *M. galloprovincialis*, *C. gigas* e *C. virginica*, respectivamente. Sequências de todos os quatro principais Clans de CYP foram identificadas em ESTs e contigs de *M. californianus* e *C. gigas* e estão listados na Tabela 16.

Tabela 16. Número de CYPs identificados em banco de dados de ESTs de bivalves.

Espécies	Número de ESTs disponíveis no Genbank em maio de 2009	Número de CYPs indetificados	Clans de CYP das ESTs identificadas
<i>M.californianus</i>	42,354	<u>58</u>	<u>2, 3, 4, mito</u> *
<i>M. galloprovincialis</i>	19,699	12	2, 4 *
<i>C. gigas</i>	29,573	<u>39</u>	<u>2, 3, 4, mito</u> *
<i>C. virginica</i>	14,560	<u>14</u>	<u>2, 3, mito</u> *

* Clan 2 inclui famílias 1, 2, 17 e 21 de CYP; Clan 3 inclui famílias 3, 5, 6 e 9 de CYP; Clan 4 inclui família 4 e o clan mitocondrial (“mito”) inclui famílias de CYP 11, 24 e 27 (Nelson, 1998).

O mexilhão *M. californianus* e a ostra *C. gigas* foram escolhidos para as análises subsequentes por apresentarem o maior número de CYPs identificados (Tabela 16). Buscas no GenBank utilizando a ferramenta BLAST mostraram que algumas sequências identificadas para *C. gigas* possuem similaridade a genes de vertebrados das famílias de CYP 1, 2, 3, 4, 17 e 27 (Tabela 17).

Tabela 17. ESTs obtidas no GenBank para a ostra *C. gigas* e alguns genes CYPs de vertebrado que apresentaram similaridade utilizando alinhamento local. Os valores de e-value e números de acesso foram obtidos no GenBank utilizando BLAST.

ESTs de <i>C. gigas</i>	tamanho em nucleotídeos	Clan	família similar	acesso / vertebrado	BLAST e-Value	EST publication
CU682274	956	2	CYP 1	AB094348.1 / cachorro	1,0 E-37	unpublished
contig 1 *	1278	2	CYP 2	XM_425230.2 / galinha	6,0 E-47	Tanguy et al.(2008)
EW777415	814	2	CYP 2	NM_001145564.1 / peixe	8,7 E-31	Roberts et al. (2009)
CB617459	491	3	CYP 3	DQ924960.1 / humano	4,6 E-33	Boutet et al. (2004)
DV736410	410	3	CYP 3	AF267126.1 / peixe	5,5 E-31	Hedgecock et al. (2007)
AM866181	581	3	CYP 3	NM_001075888.1 / gado	3,2 E-24	Tanguy et al.(2008)
AM856962	940	4	CYP 4	XM_001077977 / rato	1,0 E-40	Tanguy et al.(2008)
EW779105	842	4	CYP 4	M28655.1 / coelho	1,6 E-43	Roberts et al. (2009)
EW777481	803	4	CYP 4	BC129085.1 / rato	9,2 E-68	Roberts et al. (2009)
AM853629	533	2	CYP 17	AB292401 / peixe	3,0 E-32	unpublished
contig 2 *	1348	2	CYP 17	NM_212806.2 / peixe	1,9 E-64	Roberts et al. (2009)
AM856512	931	1	CYP 27	XM_540989.2 / cachorro	7,1 E-41	Tanguy et al.(2008)

* contig 1: CU681483, AM857094; contig 2: EW779361, AM855874

As seqüências de *M. californianus* identificadas como CYP-like e suas relações filogenéticas com genes de CYPs de famílias específicas de humanos é mostrada na árvore filogenética da Figura 15 e a representatividade das seqüências para os diferentes Clans é apresentado na Figura 16. Grande parte das seqüências de *M. californianus* (22 seqüências) situou-se nesta árvore filogenética no mesmo ramo dos CYPs da família 2 de humanos, que apresentam por sua vez 15 seqüências dentro desta família. Seqüências em ramos próximos das famílias CYP1 (7 seqüências) e CYP17 (1 seqüência), assim como outras 5 seqüências no Clan 2, também foram observadas. Portanto a maioria das seqüências CYP-like de *M. californianus*, (>50% do total), se situaram no Clan 2 (Figura 15 e 16). Cerca de 13 seqüências se situaram no mito Clan, estando em ramos próximos das famílias 11, 24 e 27. No Clan 3 foram observadas apenas 3 seqüências que mostraram proximidade das seqüências CYP3, porém também ficaram próximas a única seqüência CYP5 de humano. Apesar do ser humano possuir 12 seqüências CYP4, apenas 5 similares a CYP4 foram observadas para *M. californianus*, representando as únicas seqüências situadas no Clan 4 para esta espécie. Nenhuma família similar a CYP7, CYP8, CYP39 ou CYP51 de humanos foi encontrada. Apesar disso uma seqüência CYP26-like foi observada, diferentemente de humanos que possuem três subfamílias de CYP26. Outras duas seqüências agruparam com o único CYP20 humano.

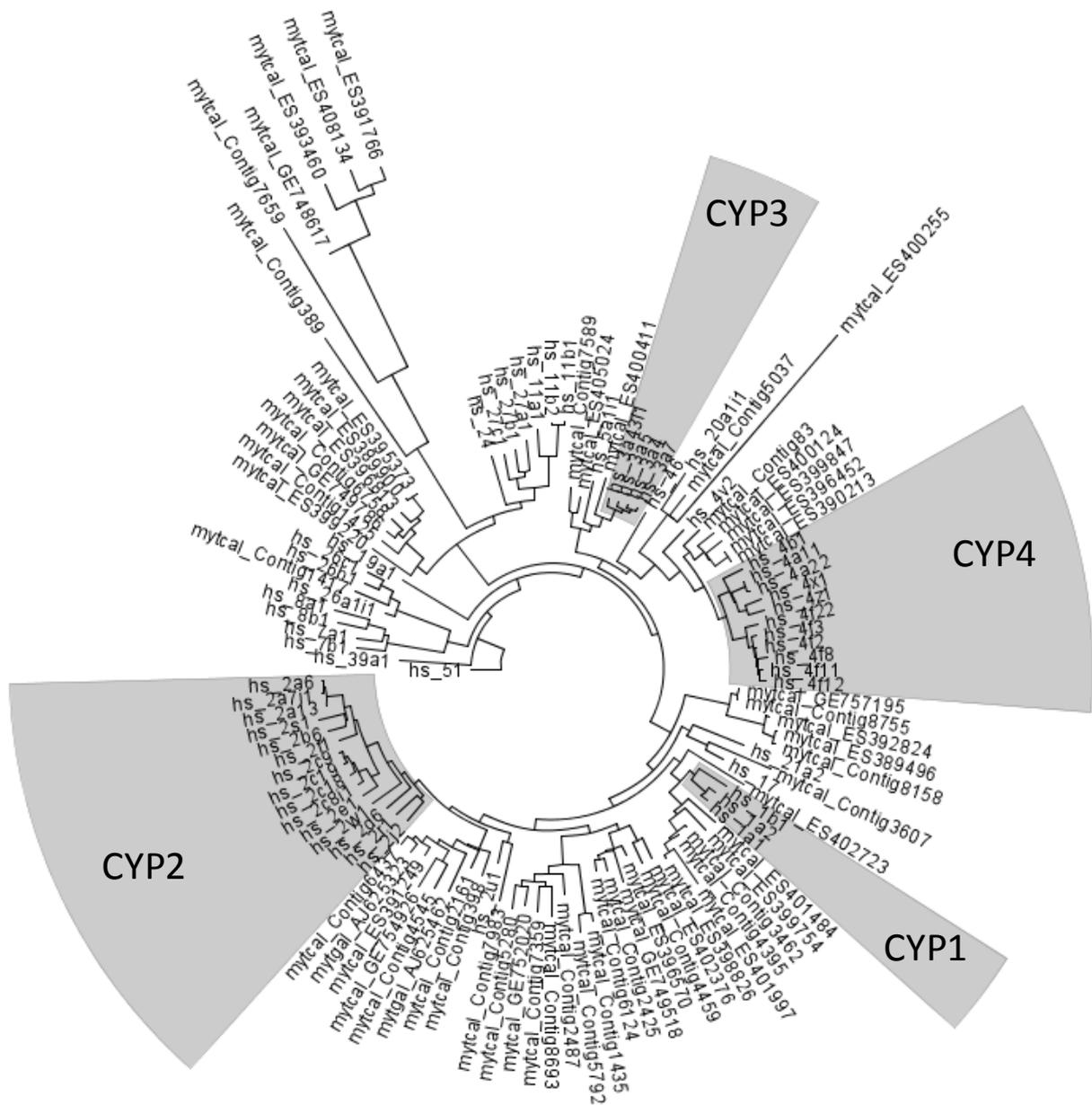


Figura 15. Análise filogenética de máxima verossimilhança para CYPs de *M. californianus* (mytcal) identificadas a partir de ESTs. Sequências traduzidas foram alinhadas com CYPs de humanos (hs) usando ClustalW. A análise filogenética foi gerada usando RAxML. Famílias de CYP 1-4 de humanos estão indicadas na árvore. *M. californianus* apresentou CYPs relacionados com as mais importantes famílias de detoxificação em vertebrados, incluindo *CYP1* e *CYP2*. Assim como em deuterostômios, o maior número de genes aparenta ser *CYP2-like*.

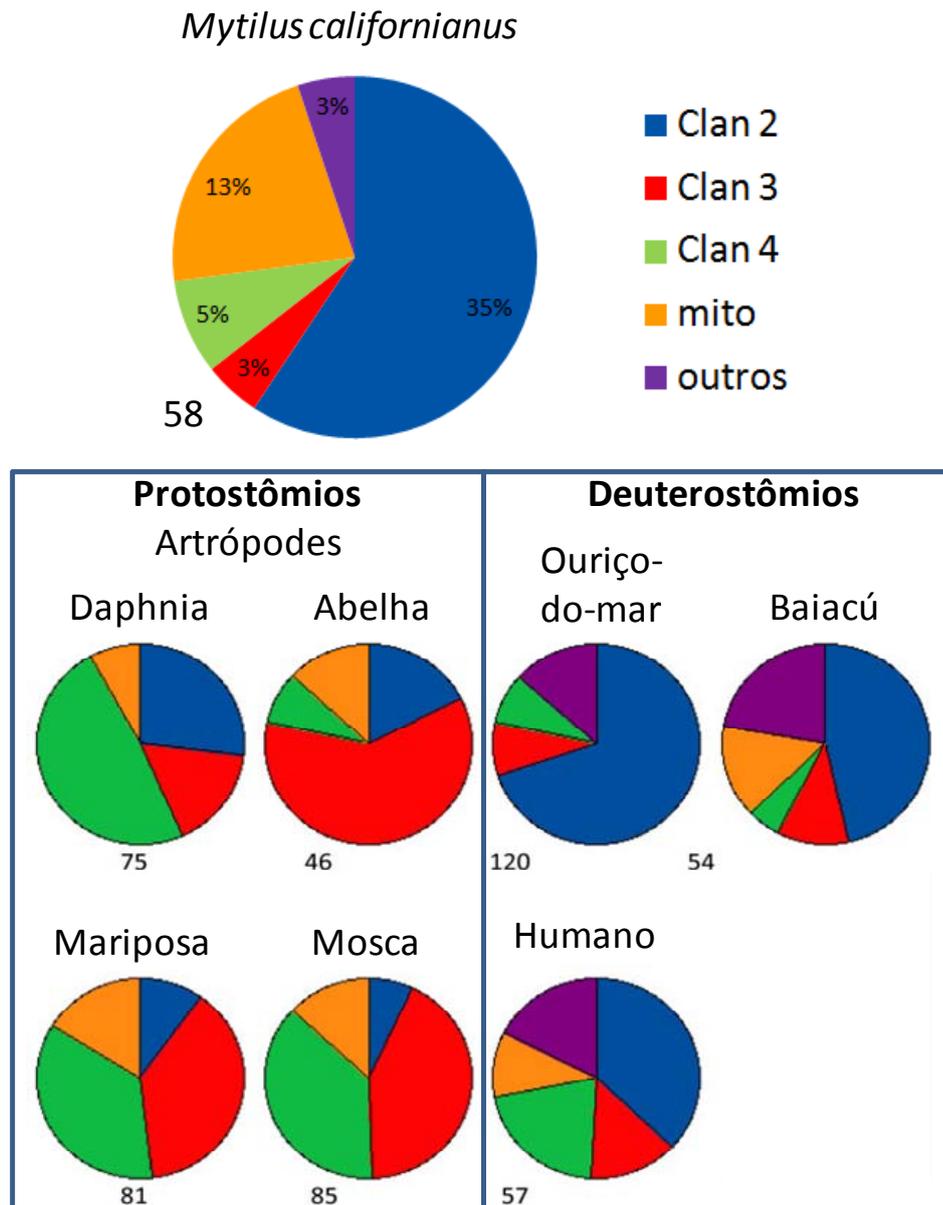


Figura 16. Representatividade das sequências CYP encontradas em bibliotecas de EST de *M. californianus* e da diversidade das sequências CYP encontradas em genomas de outros organismos (adaptado de BALDWIN; MARCO; NELSON, 2009). Clan 2 inclui famílias 1, 2, 17 e 21 de CYP; Clan 3 inclui famílias 3, 5, 6 e 9 de CYP; Clan 4 inclui família 4 e o clan mitocondrial (“mito”) inclui famílias de CYP 11, 24 e 27 (NELSON, 1998). Os números abaixo dos gráficos indicam a quantidade de sequências CYP conhecidas para estes organismos.

7.4.2. Identificação e clonagem de novos genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em *M. edulis*

Após uma identificação preliminar de aproximadamente 60 sequências CYPs em *M. californianus*, fragmentos de CYPs similares às famílias 1, 3 e 26 identificadas nesta espécie serviram

como ponto de partida para amplificação, clonagem e sequenciamento de fragmentos destes CYPs de interesse em toxicologia para uma outra espécie de bivalve, o mexilhão *M. edulis*.

Pares de iniciadores degenerados foram utilizados na identificação de um fragmento do gene *CYP1-like* de 586 bp. A porção prevista da proteína a partir do fragmento de *CYP1-like* demonstrou uma similaridade com a sequência de *M. californianus* utilizada para o desenho dos iniciadores degenerados utilizados (Figura 17 mostra o alinhamento da sequência) e o gene foi denominado temporariamente como *CYP1-like* (a). Devido à alta similaridade observada entre estas espécies de bivalves, optou-se pelo desenho de pares de iniciadores específicos baseados nas sequências previamente obtidas para *M. californianus* para amplificação de CYPs de interesse em *M. edulis*. Pares de iniciadores específicos para os genes *CYP1-like* (b), *CYP3-like* (b), *CYP3-like* (c) e *CYP26-like* amplificaram os fragmentos de tamanho esperado de 831, 663, 662 e 644 bp, respectivamente. As denominações CYP, acrescido do número da família juntamente ao sufixo “-like” foi utilizado neste estudo, uma vez que um sistema de classificação apropriado para CYPs de moluscos não foi estabelecida até o presente momento. As letras no final de cada nome de CYPs de *M. edulis* (ex.: a, b e c), foram adotadas aqui apenas para representar as diferentes isoformas identificadas neste estudo e não representam nomenclatura oficialmente reconhecida para CYPs.

A anotação preliminar das sequências parciais identificadas foi realizada utilizando busca tBLASTx no GenBank. Esta busca demonstrou que uma das sequências, anotada no decorrer deste estudo como *CYP3-like* (b), havia sido previamente identificada e a sequência completa deste gene da espécie *M. edulis* havia sido depositada no GenBank (acesso AB479539). O uso da ferramenta tBLASTx também permitiu a identificação de outra sequência completa de um gene *CYP3-like* em *M. edulis* desconhecida antes do presente estudo (acesso AB479540). Esta terceira sequência de *CYP3-like* foi denominada no presente estudo como *CYP3-like* (a). A sequência denominada aqui como *CYP3-like* (c) ainda não havia sido submetida no GenBank por nenhum outro grupo de pesquisa, representando uma nova sequência de *CYP3-like* em *M. edulis*. A partir dos fragmentos identificados, foram clonadas as extremidades 3' e 5' dos genes *CYP1-like* (a), *CYP1-like* (b) e *CYP3-like* (c), utilizando a técnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) e iniciadores específicos.

7.4.3. Análise filogenética de *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em *M. edulis*

Foram identificadas sequências de *M. edulis* para os genes *CYP1-like (a)*, *CYP1-like (b)*, *CYP3-like (a)*, *CYP3-like (b)*, *CYP3-like (c)* e *CYP26-like* com 1683, 1433, 1906, 1965, 1614 e 643 nucleotídeos, respectivamente, obtidas tanto por técnicas de clonagem e sequenciamento como por busca no GenBank (apenas para *CYP3-like_a* e *CYP3-like_b*). Regiões codificantes completas foram obtidas para os genes *CYP1-like (a)*, *CYP3-like (a)*, *CYP3-like (b)*, que apresentaram sequências proteicas com 502, 503 e 515 aminoácidos, respectivamente. Para *CYP1-like (b)* e *CYP3-like (c)* foram obtidas sequências de 461 e 468 aminoácidos, com apenas 35 e 40 aminoácidos faltando na porção amino-terminal da proteína, respectivamente (Figura 17 e 18, respectivamente). Porém esta região da proteína não inclui nenhuma região de reconhecimento de substrato de CYP (dados não mostrados). Uma vez que a região amino-terminal é extremamente variável em CYPs e é geralmente mascarada nos alinhamentos deste grupo de genes, isto não foi considerado um impedimento na caracterização filogenética para estes novos CYPs. A partir do fragmento de *CYP26-like* identificado em *M. edulis* foi obtida uma proteína de 214 aminoácidos, o que representa aproximadamente metade do tamanho de uma proteína CYP típica (~500 aminoácidos). Este fragmento demonstrou uma identidade de 95 % com um contig de *M. californianus*, obtido no GenBank (números de acesso GE748446 e GE750743). A partir desta sequência homóloga ao *CYP26-like* de *M. edulis* foi obtida a sequência codificante completa para uma proteína de 465 aminoácidos. O alinhamento das sequências de aminoácidos traduzidas a partir dos genes identificados em *M. edulis*, com possíveis genes homólogos em *M. californianus* e genes similares em *Homo sapiens* são apresentadas nas Figuras 17, 18 e 19.

As sequências traduzidas de aminoácidos de *CYP1-like (a)* e *CYP1-like (b)* de *M. edulis* apresentaram 33 % e 28 % de identidade com *CYP1A1* de humano, respectivamente, o que é insuficiente para incluí-las na família 1, segundo critérios de nomenclatura sugeridos por Nelson et al. (1996). Porém a árvore filogenética construída com membros de todas as famílias de CYPs, demonstrou tratarem-se de sequências pertencentes ao mesmo ramo da família CYP1 de vertebrados, ao invés de outras famílias do Clan 2 (*CYP17* e *CYP2*), e por este motivo, estes genes foram anotados como *CYP1-like* neste trabalho. As sequências proteicas traduzidas mostram que *CYP1-like (a)* e *CYP1-like (b)* de *M. edulis* apresentaram similaridade de 46 % entre si, e portanto, fazem parte da

mesma família. *CYP1-like (a)* de *M. edulis* e *M. californianus* apresentaram 89 % de identidade, representando possíveis sequências homólogas nestas duas espécies de *Mytilus*.

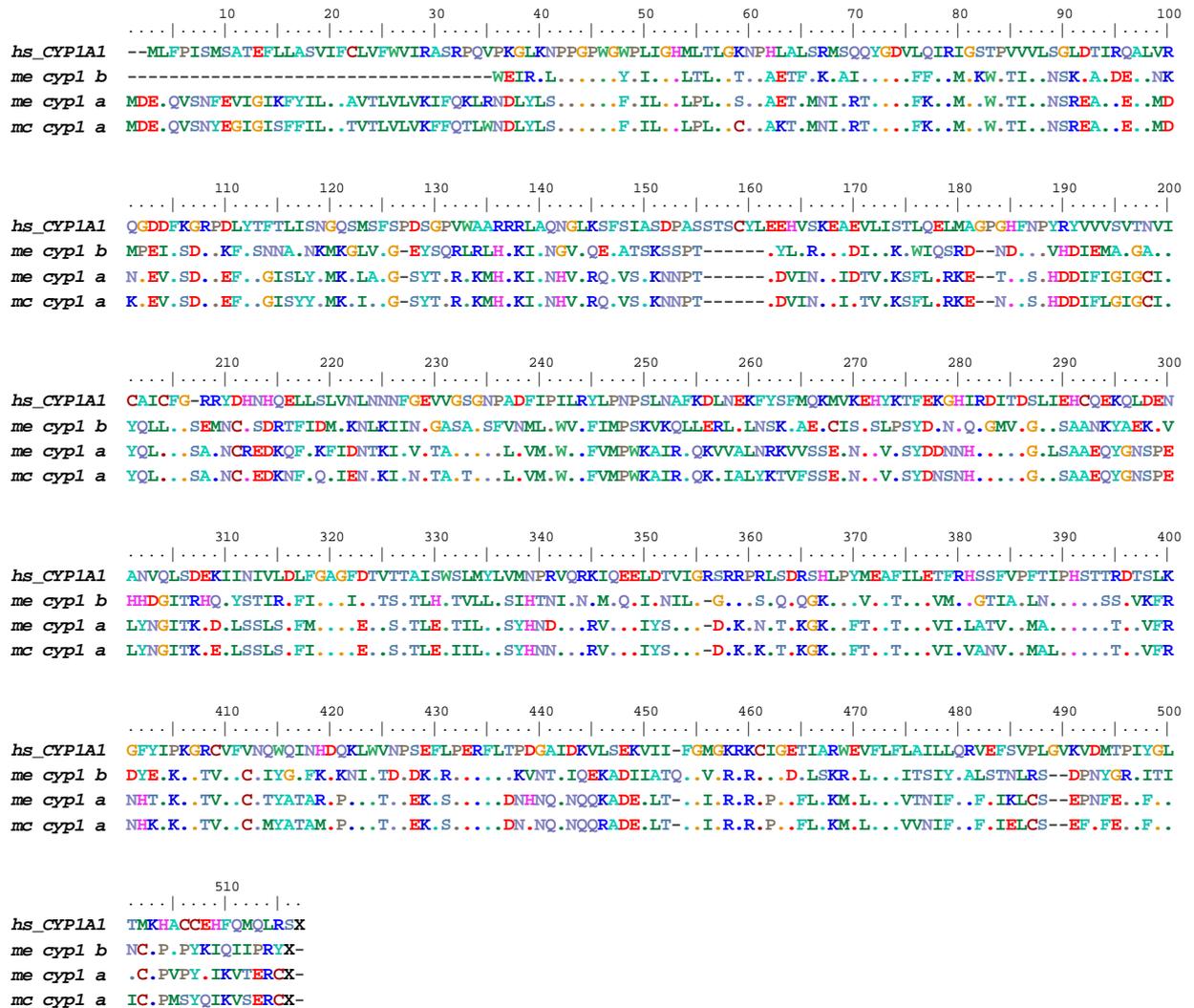


Figura 17. Alinhamento das sequências de aminoácidos de *CYP1-like (a)* e *CYP1-like (b)* de *M. edulis* (me) com uma sequência de *CYP1-like (a)* de *M. californianus* (mc) não anotada previamente e uma sequência de CYP1A1 de *Homo sapiens* (hs) obtidas no GenBank (alinhamento múltiplo - Clustalw). Os pontos indicam identidade em relação a *CYP1A1* e cores iguais representam características químicas semelhantes dos aminoácidos.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
hs CYP3A4  MALIPDLAMETWLLLAVALVSLV-LYLYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYH-KGFCMPDMECHKKYGVKVGFPYDQQPVLAITDPDMIKRTVLVKEC
me_cyp3 a  .DILGFVITVPG.V.TIII.IIT....SLWH.S.WRRN....K.T.P....VLPLEKKH.LAKA.L.LV....S.V.V.N.LL....LVS..A...EIFI..F
me_cyp3 b  .DVLGLVDIPS.IFTILLFIPT....TLWK.T.WRR..V...I.F.I..S.KDLAV..VSKT.QDLVP...S.V.V.N.TI...LV..T.L..EIFI..Y
me_cyp3 c  -----E.T....ILKE.FK..S.NT.L.LVR...N.V.V.QCHI.S.LVA..E.L.EIF...F

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
hs CYP3A4  YSVFTNRRPFGVGFMSAISIAEDEEWKRLRSLLSPTFTSCKLKEVMPILAQYCDVLRNLRREAEETGKPVTLKDVFGAYSMDVITSTSFQVNIIDSLNN
me_cyp3 a  SNFTNRPI..KMDKETA.SVGT.F.NH..F...T....S...Q.L..K.HRCCTD..E.IEQQR-EKGHIDM.E.C...T...A..A..IEAN.QKE
me_cyp3 b  QTFTNRVLLIKTDLLD.M.TA...DH..FI..TMT.....N.L.M.LRCC.D.N.INGKL.QNDT.EMTE...GFTL...A..A..LQVN.QKE
me_cyp3 c  SNFPNRPI.VK.TER.LAGVAL.QGTH..F...TI....V...L..QK.EKCCQA..E.IHSORGDNE..DM.ELC..FT...S..A..IEVN.QKE

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
hs CYP3A4  PQDPFVFNKIKLLRFDFLDPPFLSITVFPFLIPILEVLNIC--VFPREVTFNLRKSVKRMKESRLEDTQKHRVDLQLMIDSQNSKETES-----
me_cyp3 a  .NNQ..KHA.EAALGEIFKIK..L.ML...KNLVS.QLS----SKA.ND.FKTV.DSAI.L.TKQQ-EVYN.....LNARHDTQS-----DYFTK
me_cyp3 b  .DNE..T...T.TDSVVK.Y.VIVMI...KNLMGT.FKAP-.GEGSED.F.NI.QQLVAE.KSNSNS.FR..I...LN.HKD.TK.KENGRIDELGG
me_cyp3 c  .NNR..YYG..AAIGQLASS.AVF.MM...KN.IGTILLRGNRVGKD.IE.FDTALRSIDL.K.GKNEQYQ.....MNARHKD.K-----

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
hs CYP3A4  -----HKALSDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMVELATHPDVQKQLQBEIDAVLPPNKAPPTYDITVLMQEMVLDMMVNEITRLRFPJAMRLERVCKK
me_cyp3 a  GDVQEFKNRG.NNI..KENAVT.FI..D..ANT...AC.C...NQ...G.CID..EN..Q-GGT.QMEDLVKL...RFF..V...YGA.S.FH.AARE
me_cyp3 b  LDFSEYKNGRMEN.ILTN.MV.FG..FD..KTTT..AA.V..L..M.ER.FT...NE.G-S...SLPN.K..E.FLA.V...YAAVP.IN.RA.S
me_cyp3 c  -----RG.NEM..KSNAMT.FL...D..ANT...AC.A...NS.I.K..IQ...T..C-GEK.Q.EDISKLQ...RF...V...YGA.T.FN.E.QS

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
hs CYP3A4  DVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDEKQWTEPEKFLPERFSKKNKDNIDPVIYTPPGSGERNICIMRFPALNMKMLALIRVLFQNFSPKPKCKETQIPLKLSL
me_cyp3 a  .MTVC.VH...D.N.GV.V...N...PD..R.D.D..TDE..AKRPE.TFV...V..I...L...EA.M..VEM..R.T.S..S..E..VE.EQ
me_cyp3 b  .ITV.....DTD.T..IS...N...P...D...TDE..ATRPM.S.L..L..V...L..IET.Y...SXV...K.VVGSK.E..MP.EK
me_cyp3 c  .IK.KDT...TDISV..F...N.EF.PD.D..D...TED.ISKRPE.SFI...I...L..LEA.M..VYM...TV.DT.E..VTFEK

      510     520
hs CYP3A4  GGLLQPEKFPVVLKVESRDGTVSGAX
me_cyp3 a  .AIRAKNGIK.NINK.X-----
me_cyp3 b  .FITR.LNGIH..I.K.X-----
me_cyp3 c  .FV.KAONG...NANP.KD.QX---

```

Figura 18. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de *CYP3-like (a)*, *CYP3-like (b)* e *CYP3-like (c)* de *M. edulis* (me) com uma seqüência de CYP3A4 de *Homo sapiens* (hs) obtida no GenBank e) (alinhamento múltiplo - Clustalw). Os pontos indicam identidade em relação a *CYP3A4* e cores iguais representam características químicas semelhantes dos aminoácidos.

A seqüência de aminoácidos traduzida do gene *CYP3-like (a)* apresentou identidades de 50% e de 58% em relação a *CYP3-like (b)* e *CYP3-like (c)*, respectivamente, e a seqüência traduzida para estes dois últimos genes apresentaram 46% de identidade entre si. Identidades de 39%, 40% e 40% foram obtidas para *CYP3-like (a)*, *(b)* e *(c)* em relação a CYP3A4 de humanos, respectivamente. As seqüências *CYP3-like (a)*, *(b)* e *(c)* de *M. edulis*, apresentaram identidade de 34, 37 e 35% em relação a CYP30, uma seqüência 36% idêntica a CYP3A4 de humano descrita para o bivalve *Mercenaria mercenaria* na literatura, utilizando-se alinhamento não-mascarado (BROWN; CLARK; VAN BENEDEN, 1998).

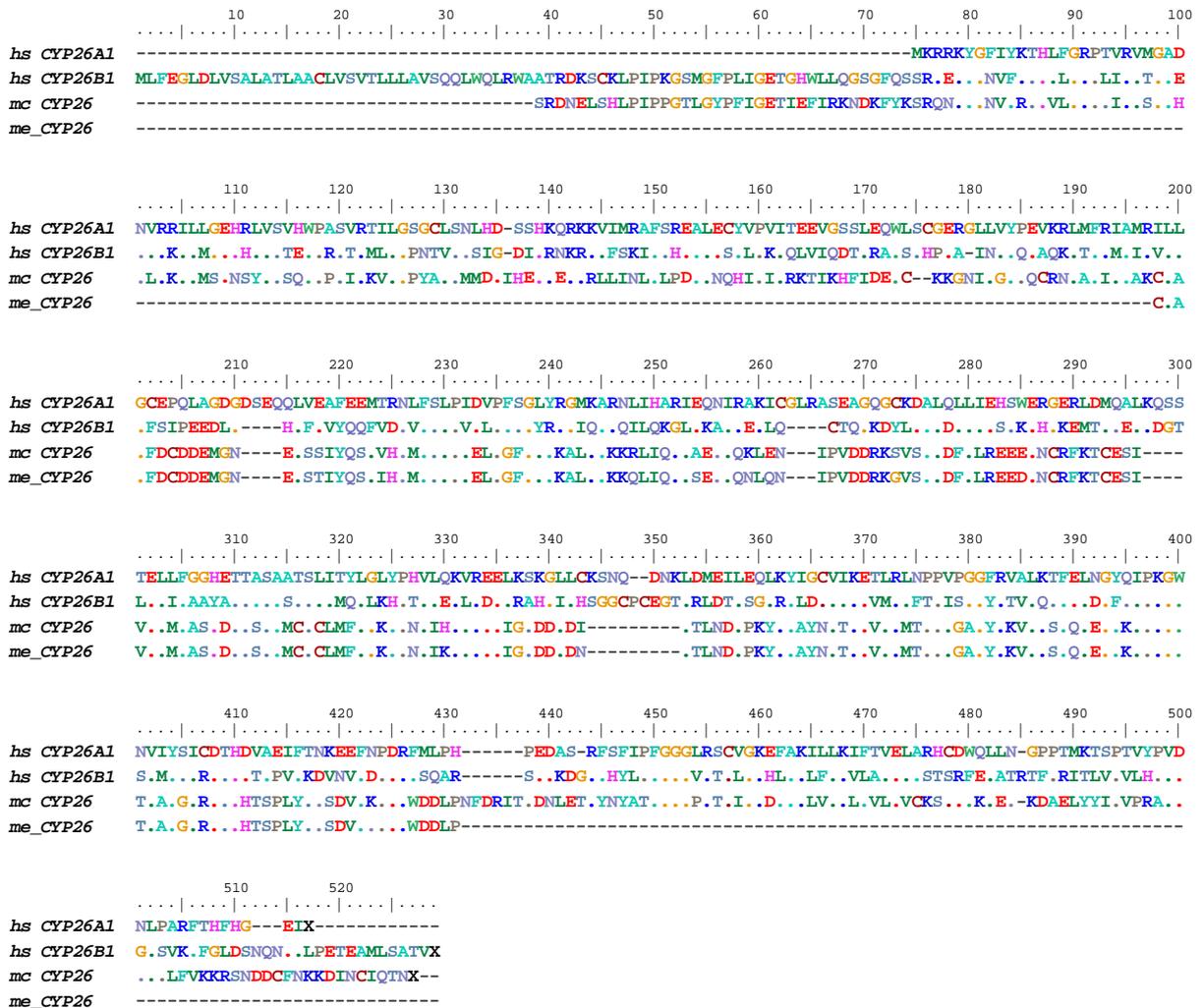


Figura 19. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de *CYP26-like* de *M. edulis* (me) com uma seqüência de *CYP26-like* de *M. californianus* (mc) não anotada previamente e seqüências *CYP26A1* e *CYP26B1* de *Homo sapiens* (hs) obtidas no GenBank (alinhamento múltiplo - Clustalw). Os pontos indicam identidade em relação a *CYP26A1* e cores iguais representam características químicas semelhantes dos aminoácidos.

A alta identidade (94,8 %) observada entre o fragmento de 644 bp de *CYP26-like* de *M. edulis* e a região alinhada correspondente a esse fragmento em *M. californianus* sugere fortemente que esses genes são homólogos nas duas espécies de *Mytilus*. Uma identidade de 36 % e 35 % foi observada entre a seqüência de *CYP26-like* de *M. californianus* e *CYP26A1* e *CYP26B1* de humano, respectivamente.

Todas as seqüências apresentaram as assinaturas dos motivos estruturais conservados em proteínas CYP. Dentre eles estão hélice-C (WxxxR), hélice-I (GxE/DTT), hélice-K (ExxR), PERF (PxxFxPE;DRF) e região de ligação do grupamento Heme (xFxxGxRxCxG) em sua seqüência proteica (Rewitz et al., 2006).

Análises filogenéticas para as sequências CYP1-like (a), CYP1-like (b), CYP3-like (a), CYP3-like (b), CYP3-like (c) e CYP26-like de *M. edulis* confirmaram as relações sugeridas anteriormente através do alinhamento das sequências proteicas. Além disso, tais análises foram utilizadas para agrupar CYPs de invertebrados e vertebrados a fim de demonstrar as semelhanças entre essas sequências não apenas com os genes CYP de vertebrados, mas também com genes CYPs de diferentes grupos de invertebrados (Figura 20).

A Figura 20 mostra que as sequências completas de *M. edulis* agruparam com CYPs de vertebrados, de forma semelhante ao observado para o estudo preliminar com ESTs de *Mytilus californianus* (Figura 15). Porém para CYP3-like, foi mostrado que todas as sequências completas de *M. edulis* agruparam com CYP3s de vertebrados, o que não havia sido observado no estudo com ESTs de *M. californianus*, onde algumas delas foram agrupadas também com CYP5 (Figura 15).

Várias sequências não-annotadas de CYPs obtidas no genoma do molusco gastrópode *Lottia gigantea* agruparam-se de forma mais próxima com os CYPs de *Mytilus edulis* do que com as sequências dos outros grupos animais, representados por um equinodermo, um artrópode e dois vertebrados. Sequências de mosca e ouriço-do-mar agruparam melhor com CYP3 de vertebrados do que as sequências CYP3-like identificadas nos moluscos *M. edulis* ou sequências não-annotadas de *Lottia gigantea*. No caso de CYP1, sequências de ouriço-do-mar foram as que melhor agruparam com os CYP1s de vertebrado, seguido dos moluscos (*Mytilus* e *Lottia*). Diferentemente do observado para moluscos e equinodermo, foi observada uma ausência de sequências de mosca no ramo dos CYP1s nesta árvore. Interessantemente, CYP26-like de *M. edulis* e outras duas sequências de *Lottia gigantea* foram as que melhor agruparam com CYP26 de vertebrados, seguidos por duas sequências de ouriço-do-mar. Não foram observadas sequências de mosca no ramo dos CYP26s desta árvore.

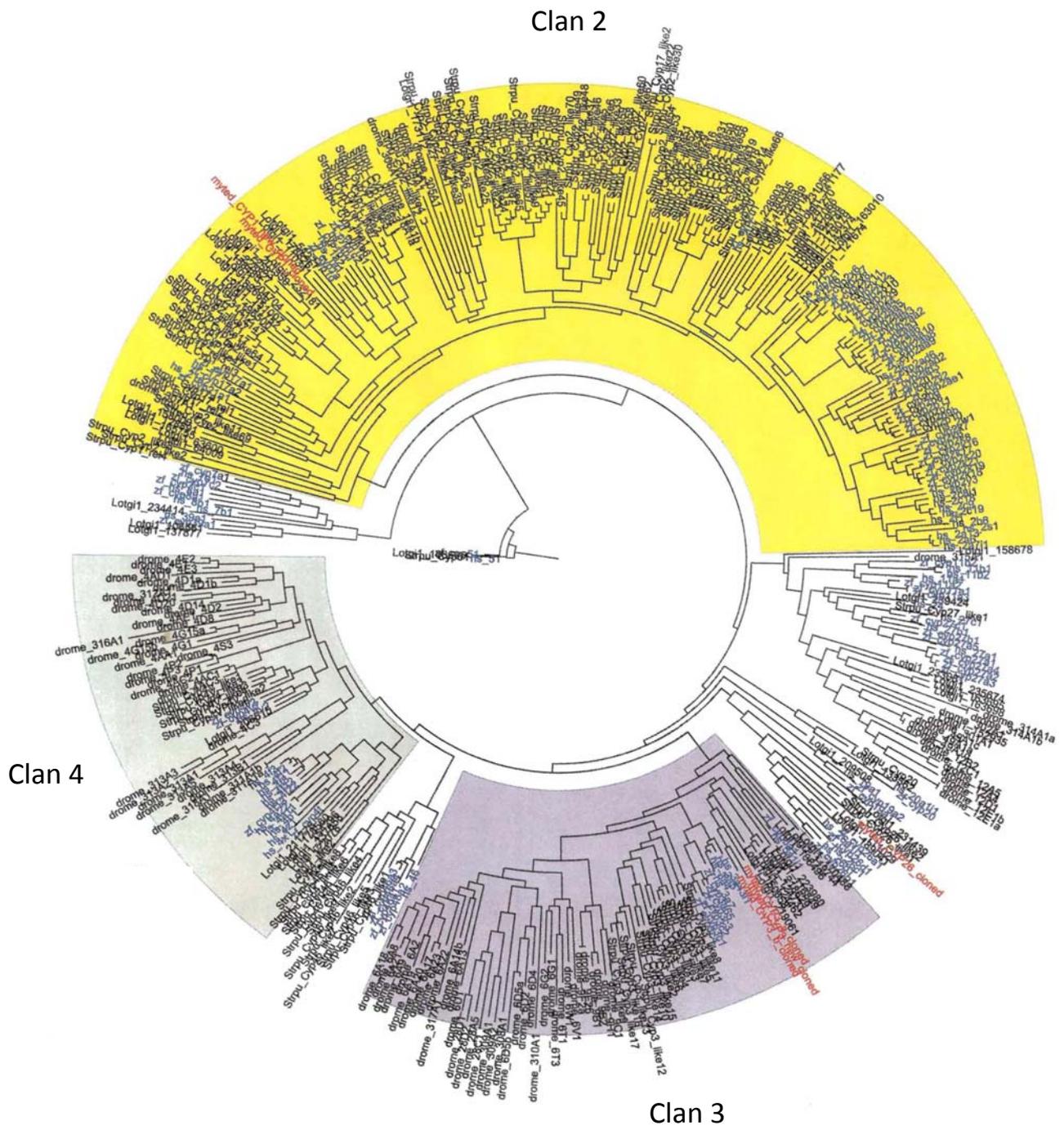


Figura 20 - Análise filogenética de máxima verossimilhança para proteínas CYP1-like (a), CYP1-like (b), CYP3-like (a), CYP3-like (b), CYP3-like (c) e CYP26-like de *M. edulis* (*myted*, anotação em vermelho) caracterizadas no presente estudo. As sequências de *M. edulis* foram agrupadas com CYPs identificados em genomas dos invertebrados *Lottia gigantea* (anotado como Lotgi; molusco, gastrópode), *Drosophila melanogaster* (anotado como drome; inseto, artrópode), *Strongylocentrotus purpuratus* (anotado como Strpu; equinodermo, ouriço-do-mar), e os vertebrados *Homo sapiens* e *Danio rerio* (anotação hs e zf em azul) (ClustalW; RaxML). As cores amarelo, roxo e cinza, marcadas na árvore, indicam as sequências pertencentes aos Clans 2, 3 e 4, respectivamente.

7.4.4. Expressão de genes *CYP-like* em diferentes órgãos de *M. edulis*

Um padrão bastante similar nos níveis de expressão gênica nos diferentes órgãos de *M. edulis* foi observado para os *CYP1-like* (a) e (b). Maiores níveis de ambos genes *CYP1-like* foram observados na glândula digestiva. Para *CYP1-like* (a), gônada e palpos labiais apresentaram níveis intermediários de expressão gênica, que foram mais altos do que o pé, que apresentou a menor expressão para este gene. *CYP1-like* (b) foi observado em baixos níveis de expressão para todos os órgãos, com exceção da glândula digestiva (Figura 21).

Assim como foi observado para os níveis dos genes *CYP1-like*, altos níveis de expressão dos três genes *CYP3-like* foram observados na glândula digestiva. Porém, diferentemente do padrão de expressão gênica dos *CYP1-like*, os palpos labiais e a margem do manto também apresentaram altos valores, que interessantemente, no caso dos palpos labiais foi maior em média do que os níveis em glândula digestiva, para os três *CYP3-like* analisados. Diferentemente de *CYP1-like*, que apresentavam os níveis mais baixos no pé, este órgão apresentou nível intermediário para os *CYP3-like* (quarto maior para *CYP3-like_b* e *c*, e quinto maior para *CYP3-like_a*). De uma forma geral, os níveis mais baixos para os *CYP3-like* foram observados em brânquia, se comparado ao nível de expressão gênica de outros órgãos. Assim como para as sequências *CYP3-like*, o único gene *CYP26-like* de *M. edulis* identificado no presente trabalho, possui maiores níveis de expressão nos palpos labiais e glândula digestiva, porém palpos labiais foi o único órgão a apresentar diferença estatística com relação a outros órgãos (músculo e gônada) (Figura 21).

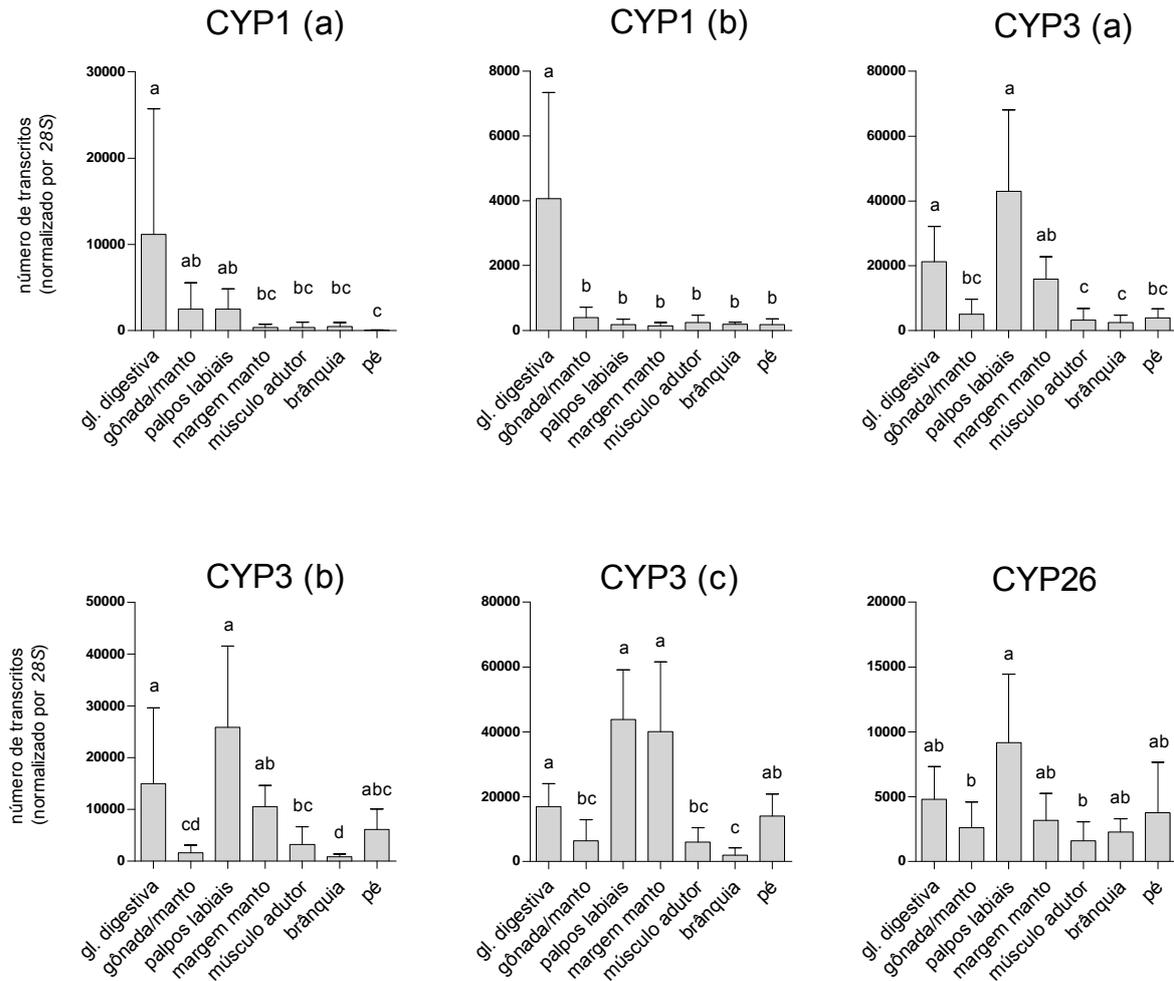


Figura 21. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real de *CYPs* em diferentes órgãos de *M. edulis*. Letras iguais indicam ausência de diferença entre os grupos (n=4-7 por grupo, Anova-Tukey post-hoc, $p < 0,05$, média \pm desvio padrão).

7.4.5. Expressão gênica dos *CYP-like* em *M. edulis* e indução por agonistas do receptor AHR.

Tanto o composto aroclor (mistura de PCBs) como o agonista endógeno do receptor AHR FICZ não causaram alteração na expressão dos genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em glândula digestiva de *M. edulis* 24 h após a injeção destes compostos (Figura 22)

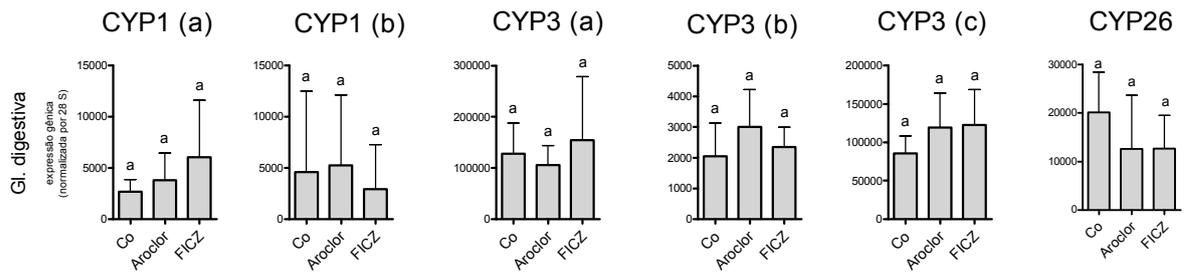


Figura 22. Expressão dos genes *CYP1-like*, *CYP26-like* e *CYP3-like* em glândula digestiva de *M. edulis* em resposta a injeção de Aroclor ou FICZ (50 μ g e 0.1 μ g por grama de carne) ou óleo vegetal (grupo controle). Não foram observadas respostas significativas entre os grupos tratados em relação ao controle (n=7 por grupo, Anova-Tukey post-hock, $p < 0,05$, média \pm desvio padrão).

Em glândula digestiva, PCB 126 causou um aumento na expressão gênica de CYP3 (b). Na maioria dos casos, os agonistas do receptor AHR, BNF e PCB126, não causaram alteração na expressão dos genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em glândula digestiva de *M. edulis* 24 horas após a injeção destes compostos. Porém, a injeção com BNF causou um aumento na expressão dos genes *CYP3-like* (a), *CYP3-like* (b) e *CYP26-like* em brânquia de *M. edulis* em relação ao grupo controle (Figura 23).

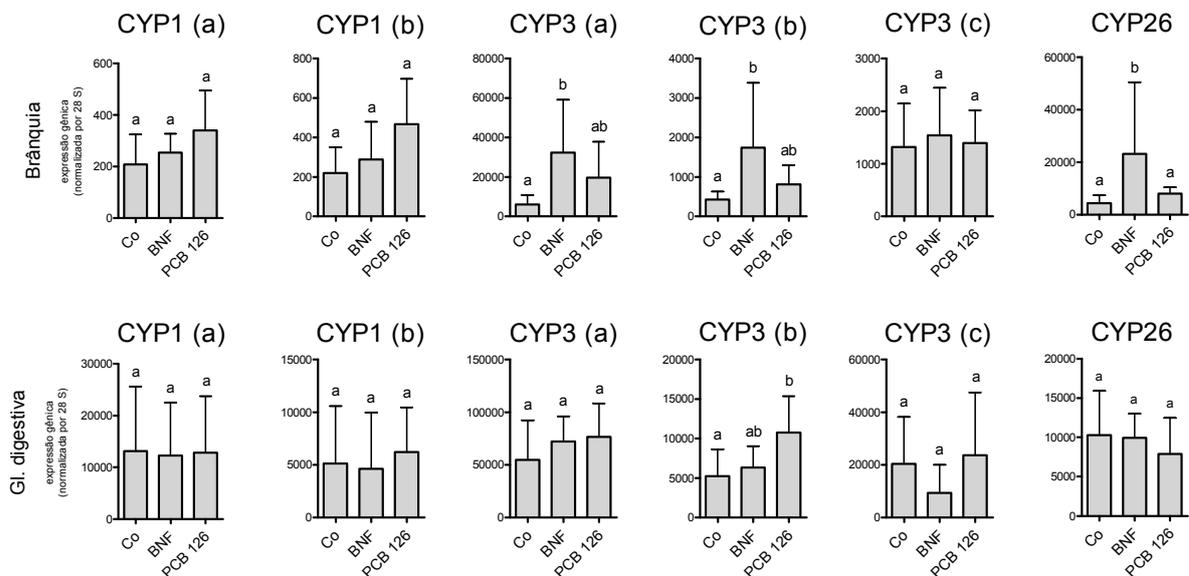


Figura 23. Expressão dos genes homólogos de *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em brânquia e glândula digestiva de *M. edulis* injetados com BNF ou PCB126 (25 μ g ou 2 μ g por grama de carne) ou óleo vegetal (grupo controle). Letras iguais indicam ausência de diferença entre os grupos (n=8) por grupo (Anova-Tukey post-hock, $p < 0,05$, média \pm desvio padrão).

7.5. DISCUSSÃO

7.5.1. Busca por novos CYPs em bancos de ESTs de bivalves

No presente trabalho, foi encontrado um total de 113 sequências de ESTs não redundantes, de citocromo P450 em moluscos bivalves, para os mexilhões *M. californianus* e *M. galloprovincialis* (58 e 12 sequências, respectivamente) e para as espécies de ostras *C. gigas* e *C. virginica* (39 e 14 sequências, respectivamente). Sequências dos quatro principais Clans de CYPs (2, 3, 4 e mitocondrial), segundo a classificação sugerida por Nelson et al. (1998), foram identificados em ESTs de *M. californianus* e *C. gigas*. Um número bastante limitado de sequências de genes CYP em moluscos bivalves está descrito e caracterizado na literatura (REWITZ et al., 2006). Dentre estas, estão uma isoforma de *CYP4-like* em *Unio tumidus* e *Mytilus galloprovincialis* (CHATY; RODIUS; VASSEUR, 2004), um *CYP3-like* de clam *Mercenaria mercenaria* (anotado como CYP30; BROWN; CLARK; VAN BENEDE, 1998) e um *CYP17-like* em *Crassostrea gigas* (CYP356A1; Toledo-Silva et al., 2008) (sequências de ESTs não foram contadas).

Nenhum CYP de organismos do Superfilo Lofotrocozoa, que inclui moluscos e uma grande diversidade de outros grupos invertebrados (ex.: sipúncula e anelídeos) foi expresso recombinantemente, e avaliado quanto sua função catalítica até o presente momento (REWITZ et al., 2006). Portanto, é difícil definir precisamente as funções catalíticas ou a importância fisiológica e toxicológica exercida pelos CYPs identificados no presente trabalho. Porém, todas as bibliotecas de EST de *M. californianus* identificadas, submetidas ao GenBank (GRACEY et al., 2007-2009, não-publicado) foram geradas a partir de organismos expostos a diferentes condições de estresse ambiental, incluindo temperatura, hipóxia, metais e salinidade. Além disso, a assinatura provisória das sequências em famílias conhecidas de genes de vertebrados inclui vários membros de famílias que estão envolvidas nas respostas a exposição a xenobióticos em mamíferos (ex.: CYPs 1, 2 e 3; NEBERT; RUSSEL, 2002). Portanto, existem fortes indícios de que muitos destes novos CYPs identificados em bivalves estejam envolvidos no sistema de defesa do mexilhão para o estresse químico e ambiental.

Recentemente, um crescente número de ESTs têm sido geradas para alguns bivalves, incluindo várias espécies dos gêneros *Crassostrea* e *Mytilus* (QUILANG et al., 2007; TANGUY et al., 2008; VENIER et al., 2009). Estas ESTs são uma valiosa fonte de informação para gerar uma amostragem preliminar da diversidade do sistema CYP em bivalves. Neste estudo, foi observado que a maior parte das sequências de *M. californianus* encontra-se no Clan 2 (> 50 % do total), o qual inclui CYPs da família 1, 2 e 17, representados por 22 sequências similares a família 2 de humano. Baldwin, Marko e Nelson (2009), ao sumarizar as proporções de genes CYPs dos diferentes Clans em organismos que possuem o seu genoma sequenciado, constatou que a dominância do Clan 2 é observada também em humanos, peixe (baiacú, *Fugu rubripes*), equinodermo (ouriço-do-mar, *Stronglyocentrotus purpuratus*), e que isso parece ser uma tendência nos grupos de deuterostômios (BALDWIN; MARKO; NELSON, 2009) (Figura 16). O mesmo também é observado no protostômio nematoda (*Caenorhabditis elegans*). Porém, tal padrão não é observado nos genomas de outros protostômios do grupo ecdízoa, como é o caso do grupo dos artrópodes *Daphnia pulex* (crustáceo), *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, e *Apis mellifera* (inseto), que possuem sequências de CYPs representadas predominantemente pelos Clans 3 ou 4, dependendo do grupo em questão (BALDWIN; MARKO; NELSON, 2009) (Figura 16).

É possível que o padrão de diversidade de CYPs observado para molusco bivalves, com expansão do número de isoformas da família 2, seja similar para outros membros do Superfilo Lofotrocozoa (ex.: anelídeos e sipúncula). Porém, revisões recentes da árvore filogenética em metazoa utilizando ferramentas moleculares, apontam para uma separação dos moluscos em um grupo monofilético irmão a um clado que inclui anelida, sipúncula, equiura, nemertina, phoronida e brachiopoda (DUNN et al., 2008), e portanto, também é possível que hajam diferenças a respeito da diversidade de CYPs destes grupos em relação a moluscos.

Este é o primeiro estudo a sumarizar, mesmo que de forma preliminar, o sistema CYP de moluscos bivalves. As sequências CYP que são mostradas representam um primeiro passo para a caracterização mais detalhada das funções e da expressão gênica destes CYPs em bivalves. Por exemplo, a partir destas sequências associado a outras técnicas, foram clonadas as sequências completas de genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em *M. edulis*, e estabelecidos padrões de

expressão em diferentes órgãos (ver abaixo). Sequências adicionais de lofotrocozoa, e a caracterização do genoma de espécies modelo neste grupo, serão necessárias para a obtenção da anotação e conhecimento da diversidade de sequências de CYP neste grupo tão pouco estudado.

7.5.2. Análise das sequências de *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* em *Mytilus edulis*

Foram clonados e sequenciados novos membros da superfamília CYP no mexilhão *Mytilus edulis* similares as famílias 1, 3 e 26 de vertebrados. Tais sequências foram comparadas em uma árvore filogenética contendo genes identificados no genoma de um mamífero (humano) e de um teleosteo (*Danio rerio*, peixe-zebra) previamente caracterizados (GOLDSTONE et al., 2006). CYPs identificados em genomas de invertebrados, também foram incluídos na análise. Dentre eles, estava o invertebrado deuterostômio ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (ouriço-do-mar; equinodermata) e invertebrados protostômios *Drosophila melanogaster* (artropoda; insecta) e *Lottia gigantea* (molusca; gastropoda) (GOLDSTONE et al., 2006). As sequências de aminoácidos deduzidas em *Mytilus* apresentaram tamanho e assinaturas dos motivos estruturais conservados hélice-C, hélice-I, hélice-K, PERF e região de ligação do grupamento heme, característico de CYPs de vertebrados e invertebrados (REWITZ et al., 2006).

A obtenção da sequência codificante completa dos genes CYP é geralmente requerida para sua classificação, uma vez que a conservação varia ao longo da sequência protéica. O sistema de classificação de CYPs usado correntemente estabelece identidades protéicas de corte de 40 % ou 55 %, para serem classificadas nas mesmas família ou sub-família, respectivamente (NELSON et al., 1996). As proteínas CYP deduzidas de *Mytilus* apresentaram identidade de 28% - 40 % com sequências de famílias específicas em vertebrados, o que *a priori*, não é suficiente para enquadrá-las nas respectivas famílias. É provável, entretanto, que estas porcentagens de identidade sejam maiores se regiões ambíguas no alinhamento forem mascaradas, o que geralmente é aceito na análise de genes CYP (VERSLYCKE; GOLDSTONE; STEGEMAN, 2006; GOLDSTONE et al., 2007). Apesar de serem poucos os casos em que CYPs de invertebrados possuem identidade suficiente para serem incluídos nas mesmas famílias de vertebrados (REWITZ et al., 2006), a análise filogenética realizada sugere que as sequências podem ser anotadas de forma preliminar como sendo sequências similares as

famílias 1, 3 e 26, e portanto, foram adotados os termos *CYP1-like (a)*, *CYP1-like (b)*, *CYP3-like (a)*, *CYP3-like (b)*, *CYP3-like (c)* e *CYP26-like*. As anotações preliminares, como *CYP-like* foram preferidas no presente trabalho, em lugar de anotações oficiais utilizadas frequentemente para novas sequências *CYP* de moluscos (ex.: *CYP30* e *CYP356A1*; BROWN; CLARK; VAN BENEDEN, 1998; TOLEDO-SILVA et al., 2008). Este tipo de anotação foi utilizada uma vez não existem informações suficientes a respeito do Superfilo Lofotrocozoa em geral, para um sistema de classificação de CYPs adequado para este grupo, apesar de alguns membros desse grupo já possuírem o genoma sequenciado (ALBALAT; CANESTRO, 2009). A denominação com letras (ex.: a, b e c) não é oficial e foi utilizada aqui apenas para diferenciar as isoformas similares de uma mesma sub-família. A falta de concordância observada entre a análise filogenética e a identidade de corte de 40 % para famílias de CYP, reforça a idéia de que o sistema de nomenclatura atualmente utilizado para CYPs não se mostra muito adequado para invertebrados, e portanto, necessita de ajustes que acomodem distâncias evolutivas maiores do que aquelas observadas em vertebrados (GOLDSTONE et al., 2007).

As sequências *CYP1-like* identificadas em *M. edulis* apresentaram similaridade de 33 % e 28 % com *CYP1A1* de humano, e identidade de 46 % entre elas, o que sugere o agrupamento de ambas sequências de *Mytilus* em uma única família. Evolutivamente, na linhagem dos deuterostômios, genes *CYP1-like* foram identificados em equinodermos, considerados pré-vertebrados, e também foram detectados no genoma de tunicados, considerados uma linhagem basal de cordados. Porém até então, não foram identificados em protostômios (GOLDSTONE et al., 2007). Apesar disso, sequências *CYP1-like* estão presentes no genoma do molusco gastropode *Lottia gigantea* (GOLDSTONE, 2008, comunicação pessoal). As identidades das sequências *CYP1-like* de *M. edulis* encontradas no presente trabalho em relação a *CYP1s* de vertebrados, encontram-se na faixa do nível de identidade daquelas observadas entre *CYP1s* de Ciona e vertebrados (21-41 % de identidade) e ouriço e vertebrados (38%) (GOLDSTONE et al., 2007). Tais constatações sugerem que um conhecimento mais aprofundado do grupo lofotrocozoa e um sistema mais adequado de classificação, possam vir a enquadrar estas sequências como *CYP1*, ou como uma nova família de *CYPs*.

A árvore filogenética mostrou que sequências *CYP1* de ouriço-do-mar foram as que melhor agruparam com os *CYP1s* de vertebrado, seguido dos moluscos (*Mytilus* e *Lottia*), o que concorda com

as similaridades previamente anotadas por GOLDSTONE et al. (2007) para ouriço-do-mar. Diferentemente do observado para moluscos e equinodermos, foi observada uma ausência de sequências de mosca no ramo dos *CYP1s* nesta árvore. O fato de que CYPs são muito mais estudados em artrópodes, principalmente insetos, do que em qualquer outro protostômio, pode ter ajudado na inferência até então de que *CYP1* é uma família restrita a vertebrados (REWITZ et al., 2006). Estudos filogenéticos mais detalhados ajudarão a incluir, ou não, genes de protostômios na família *CYP1*.

As três sequências *CYP3-like* apresentaram uma identidade 39-40 % com os *CYP3* de vertebrados, e 46-58 % de identidade entre si. Considerando-se que não foi usado qualquer mascaramento de regiões ambíguas é provável que a utilização deste artifício seria suficiente para agrupar esses genes na família 3 de vertebrados (>40%). O caráter conservado para *CYP3* em grupos animais foi observado anteriormente nas comparações de um organismo da linhagem basal dos deuterostômio, o tunicado *Ciona* (Verslycke et al., 2007), ou *CYP30* identificado no molusco bivalve *Mercenaria mercenaria* (BROWN; CLARK; VAN BENEDEN, 1998), com *CYP3* de vertebrados. Considerando-se relações filogenéticas destes grupos (tunicados e moluscos), com os vertebrados, era de se esperar que tunicado apresentasse genes *CYP3* com uma maior identidade, porém, esse não parece ser o caso uma vez que *CYP30* apresenta identidade consideravelmente maior (VERSLYCKE; GOLDSTONE; STEGEMAN, 2007). Interessantemente, os *CYP3-like* de *Mytilus* apresentaram maior identidade para *CYP3* de vertebrados, do que os *CYP3* de tunicado, ou do que o previamente identificado *CYP30* de bivalve. Além disso, a identidade dos três *CYPs* de *Mytilus* com *CYP30* de *Mercenaria* não é tão expressiva (34-37%) quanto a encontrada em relação aos *CYP3s* de vertebrados (39-40%). Estas constatações sugerem que *CYP3-like* de *Mytilus* sejam mais similares aos de vertebrados, do que se poderia imaginar, baseando-se em análises prévias de outros invertebrados. Em ecdízoa (*D. melanogaster*), *CYP3* de vertebrados diversificaram-se nas famílias *CYP6s* e *CYP9s*, e em ouriço, as relações de genes similares a *CYP3* ainda não são bem estabelecidas, apesar de apresentarem altas identidades com relação a *CYP3* de vertebrados (VERSLYCKE; GOLDSTONE; STEGEMAN, 2006). Um estudo mais detalhado com membros do Clan 3 é necessário para o estabelecimento de divisões classificatórias para invertebrados e vertebrados dentro deste grupo, que possivelmente possuam uma linhagem gênica ancestral comum que divergiu de 800 a 1000 milhões de

anos, antes da divisão entre deuterostômios e protostômios (VERSLYCKE; GOLDSTONE; STEGEMAN, 2006).

Os primeiros genes *CYP26* de organismos não-deuterostômios a serem identificados foram obtidos e caracterizados apenas recentemente nos genomas do molusco gastropode *Lottia gigantea* (dois genes) e do anelida poliqueta *Capitella sp* (quatro genes), ambos pertencentes ao superfilo lofotrocozoa (ALBALAT; CANESTRO, 2009). Tal estudo procurou identificar genes relacionados com a maquinaria metabólica de ácido retinóico (AR), da qual o *CYP26* é um importante integrante. Porém, a existência de *CYP26* e de outros genes relacionados ao metabolismo do AR no grupo lofotrocozoa, não parece ser uma regra, uma vez que este gene não é encontrado nos genomas de outros táxons do grupo, incluindo o anelídeo *Helobdella robusta* e o platelmintos *Schistosoma mansoni* (ALBALAT; CANESTRO, 2009). A identificação da sequência similar a *CYP26* no presente estudo expande a presença deste gene, e possivelmente da maquinaria de AR, para o grupo dos moluscos bivalves, em particular para o gênero *Mytilus* (*M. californianus* e *M. edulis*). Similarmente ao estudo filogenético de Albalat e Canestro (2009) que não encontrou *CYP26* em grupos de ecdízoa (sete espécies), não foi observada a presença de um *CYP26* em *Drosophila*. Na análise do presente estudo, *CYP26-like* de *M. edulis* e outras duas sequências de *Lottia gigantea* foram as que melhor agruparam com *CYP26* de vertebrados, seguidos por duas sequências de ouriço-do-mar. Portanto, é possível que, a exemplo do observado por Albalat e Canestro (2009) para o molusco gastropode *Lottia gigantea*, uma maquinaria metabólica de AR similar a de vertebrados possivelmente esteja presente em bivalves.

Quanto às possíveis funções destas novas proteínas CYPs em bivalve, é bastante difícil avaliá-las sem uma análise mais apurada, como por exemplo, pela expressão recombinante e avaliação estrutural (GOLDSTONE et al., 2007). É importante observar que estes valores de identidade (28-40%), apesar de relativamente baixos em relação a outras espécies, não excluem a possibilidade de similaridades catalíticas para CYPs ortólogos. Por exemplo, as proteínas CYP, CYP306A1 e CYP315A1, do lepidóptero *Manduca sexta*, são apenas 33-40% idênticos aos ortólogos em díptero, mas suas funções são conservadas (REWITZ et al., 2006). De qualquer forma, especulações a respeito das funções de ortólogos CYP devem ser feitas com bastante cuidado, uma vez que mesmo proteínas

CYP com alta identidade, podem apresentar competência catalítica diferente, algumas vezes até por substituição única de aminoácido em regiões importantes (REWITZ et al., 2006).

7.5.3. Expressão gênica de CYPs no mexilhão *Mytilus edulis* e indução por contaminantes

Níveis de expressão dos genes *CYP1-like*, *CYP3-like* e *CYP26-like* foram avaliados quanto a sua distribuição em sete órgãos: glândula digestiva, gônada/manto, palpos labiais, papilas sensoriais, músculo adutor, brânquia e pé, do mexilhão *M. edulis*. A possível indução destes genes para as substâncias agonistas do receptor AHR BNF, PCB 126, aroclor 1254 e FICZ também foram avaliadas. Os resultados mostraram um padrão de expressão distinto órgão-específico para as diferentes isoformas de CYP avaliadas em *Mytilus*. Porém, foram verificadas algumas similaridades com a distribuição órgão-específica de famílias *CYP* de vertebrados, considerando-se órgãos com funções equivalentes. Quanto à indução por agonistas de AHR, os resultados indicam importantes diferenças em relação aos padrões observados em vertebrados.

Os membros da família CYP1 de vertebrados têm sido extensivamente estudados devido a sua comprovada importância no metabolismo de xenobióticos, fármacos, moléculas endógenas, carcinogênese, estresse oxidativo, hepatotoxicidade, doenças relacionadas a polimorfismos, dentre outros (NEBERT; RUSSEL, 2002). A expressão da família CYP1 em humanos é induzida via receptor AHR, um fator de transcrição que é ativado pela ligação de PAHs. Os níveis dos CYP1s de humano CYP1A1, 1A2 e 1B1 variam num padrão órgão-específico. Quanto suas funções, CYP1A1 e CYP1B1 são os mais eficientes no metabolismo de PAHs; CYP1A1 também inativa prostaglandinas; CYP1A2 e CYP1B1 hidroxilam estrógeno; enquanto CYP1A2 metaboliza arilaminas, N-heterocíclicos e cerca de 10-20 drogas diferentes (NEBERT; RUSSEL, 2002). Apesar de haver diferenças na especificidade para substratos e tipos de reações catalizadas, estas três enzimas detoxificam ou ativam vários carcinógenos de importância ambiental. Além do metabolismo de estrógenos, outras importantes funções endógenas para esta família são sugeridas, como por exemplo, o metabolismo de ácido retinóico (NEBERT; RUSSEL, 2002).

Em peixes, a alta indutibilidade da isoforma CYP1A por contaminantes ambientais (ex.: PAHs, PCB coplanares, dibenzofuranas policlorinadas e dibenzodioxinas), ao nível gênico, proteico e

catalítico, fez desta isoforma um biomarcador de contaminação aquática amplamente utilizado em estudos ambientais (PAYNE et al., 1976; BUCHELLI; FENT, 1995). Recentemente, a descoberta de outros quatro genes de *CYP1* em peixes (*IB1*, *IC1*, *IC2* e *IDI*), incluindo dois que não são induzidas por agonistas do receptor AHR (*IC2* e *IDI*), sugerem uma possível importância de membros da família 1 em funções endógenas do organismo, além das funções relacionadas a biotransformação de contaminantes (JONSSON et al., 2007a; JONSSON et al., 2007b; ZANETTE et al., 2009). A função das proteínas codificadas pelos dois genes *CYP1-like* de *Mytilus edulis* identificados no presente trabalho permanecem para ser elucidadas.

De forma geral, a importância fisiológica ou relacionada a poluição, dos genes/proteína CYP da família 1 em invertebrados deuterostômios ainda não é clara (ex.: tunicado), e em protostômios, a presença destes genes em ainda é questionável (REWITZ et al., 2006; GOLDSTONE et al., 2007; GOLDSTONE et al., 2008). Mesmo assim, muitos trabalhos têm tentado detectar algum gene, proteína, ou atividade catalítica de CYP1A em moluscos bivalves, como em ostras e mexilhões, tendo em vista o interesse neste grupo de organismos para estudos de monitoramento e toxicologia ambiental (CANOVA et al., 1998; LIVINGSTONE, 1998; SHAW et al., 2000; SOLE; NASCI; LIVINGSTONE, 2000; WOOTTON et al., 2005; MONARI et al., 2007; PETERS; NASCI; MONARI et al., 2008). Porém, uma série de problemas nas metodologias utilizadas para detecção de CYP1A em moluscos, como por exemplo, baixa atividade para os substratos de CYP1A conhecidos utilizados em ensaios catalíticos (ex.: Benzo[a]pireno e etoxiresorufina) (LIVINGSTONE; FARRAR, 1984; STEGEMAN, 1985; ; SOLE; NASCI; LIVINGSTONE, 2000), não-validação na utilização de anticorpos para proteínas e sondas para mRNA não-específicos (ex.: desenhados para peixes e mamíferos) (CANOVA et al., 1998; LIVINGSTONE, 1998; SHAW et al., 2000; SOLE; NASCI; LIVINGSTONE, 2000; WOOTTON et al., 2005; MONARI et al., 2007; PETERS; NASCI; MONARI et al., 2008), tem gerado incertezas a respeito da especificidade destas metodologias empregadas para este propósito. Por exemplo, dois dos anticorpos de CYP1A usados nos estudos citados, um “anti-truta arco íris” e “anti-perca” detectaram bandas eletroforéticas, com pesos moleculares similares a CYP1A, mas que quando identificadas por MALD-TOF-MS revelaram sequências de proteínas do citoesqueleto actina e tropomiosina (GROSVIK et al., 2006). Apesar do estudo não ter sequenciado todas as bandas que

apareceram nos géis, fica claro a necessidade de precaução ao se avaliar os dados obtidos com esses anticorpos, uma vez que nenhuma proteína detectada por eles foi identificada até o presente momento como CYP1A ou CYP1-like.

No presente trabalho, a identificação e caracterização filogenética de duas sequências *CYP1-like* em *Mytilus edulis*, possibilitaram a aplicação de uma metodologia de avaliação de expressão gênica (PCR em tempo real) específica para avaliar sua distribuição em diferentes órgãos e a possível indução por contaminantes classicamente indutores de CYP1A. Os resultados obtidos mostram que a distribuição órgão-específica da expressão gênica de *CYP1-like* de *M. edulis* é de certa forma semelhante ao padrão de distribuição da expressão gênica de *CYP1A* observada para vertebrados. Porém, substâncias indutoras da expressão gênica de *CYP1A* em vertebrados, não mostraram nenhum efeito aparente na indução dos *CYP1-like* de bivalves.

Maiores valores na expressão dos genes *CYP1-like* foram observados na glândula digestiva. A glândula digestiva de moluscos, assim como o fígado de vertebrados, possui um papel central na eliminação de xenobióticos e funções endógenas de regulação do metabolismo (MARIGOMEZ; LEKUBE; CANCIO, 1999). Estudos ainda sugerem a existência de uma regulação hormonal por estrogênio (E₂), hormônio de crescimento epidermal (EGF), insulina e zinco, no metabolismo de células isoladas desse órgão, o que inclui estimulação da atividade de enzimas glicolíticas e desregulação do balanço redox mediada por sinalização celular (ex.: tirosina quinases) (CANESI et al., 2007). Outras funções também são atribuídas a esse órgão em bivalves, como mecanismos de defesa imune e regulação homeostásica do meio interno (cálcio, pH hemolinfático, volume celular) (MARIGOMEZ; LEKUBE; CANCIO, 1999). Gônada e palpos labiais apresentaram níveis intermediários para a expressão do gene *CYP1-like (a)*, porém a expressão de *CYP1-like (b)* foi exclusivamente alta em glândula digestiva. Interessantemente, dentre os cinco *CYP1* de peixes, apenas *CYP1A* possui maiores níveis hepático de expressão gênica, enquanto todos os outros CYPs (*1B1*, *1C1*, *1C2* e *1D1*) possuem maiores níveis em tecidos extra-hepáticos (JONSSON et al., 2007b; ZANETTE et al., 2009). Supondo-se que a distribuição órgão-específica de um gene fornece informações a respeito das funções relacionadas ao mesmo, é de se esperar que alguma similaridade

entre a função dos dois *CYP1-like* de molusco, e de *CYP1A* de vertebrado possa existir, sendo ela relacionada ao metabolismo de xenobióticos, ou ao metabolismo de moléculas endógenas.

Quanto ao possível aumento na expressão dos genes *CYP1-like* de *M. edulis*, por substâncias agonistas do receptor AHR, foi observada uma ausência de indução para os compostos testados. Algumas hipóteses podem ser sugeridas: (1) O receptor AHR em *M. edulis* não existe, ou existe e não é ativado pelos mesmos agonistas do receptor AHR de vertebrados; (2) A região promotora dos genes *CYP1-like* de *M. edulis* não possuem elementos de respostas a xenobióticos (XRE) funcionais; (3) as doses de contaminante e o tempo de exposição utilizados não possibilitaram a verificação de uma “janela de resposta” quantificável. Quanto a hipótese 1, o gene homólogo ao AHR de vertebrados foi identificado e clonado em *M. edulis* (Mark E. Hahn, comunicação pessoal) e em outros invertebrados, como por exemplo *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), *Drosophila melanogaster* (Diptera) e *Mya arenaria* (Bivalvia) (WIESNER et al., 2003). Porém, no bivalve *Mya arenaria* ele não possui afinidade pelo agonista do receptor AHR mais potente conhecido (TCDD) (BUTLER et al., 2001), sendo portanto, essa uma explicação viável para a ausência de indução observada em *M. edulis*. Quanto a hipótese 2, não se conhece até o presente momento a sequência da região promotora destes genes recém identificados, e quanto a terceira possibilidade, vários tempos de exposição (KIM et al., 2008) e várias doses destes contaminantes, em doses muito menores, são suficientes para induzir fortemente *CYP1A* em fígado de peixe (JONSSON et al., 2007a; ZANETTE et al., 2009). Portanto é pouco provável que se tenha perdido uma possível janela de resposta dos animais tratados com os agonistas do AHR. De qualquer maneira, outras doses e tempos de exposição deverão ser testadas em experimentos futuros. Em suma, o presente estudo sugere que os genes *CYP1-like* em brânquia ou glândula digestiva de *M. edulis* não são fortemente induzidos pelos contaminantes testados, como é verificado em vertebrados, e portanto não apresentam aplicabilidade aparente como biomarcadores da presença de contaminantes agonistas do receptor AHR de vertebrados. Porém, é possível que haja uma regulação destes genes por outras classes de contaminantes e receptores de importância, o que sugere a necessidade de mais estudos que verifiquem a possibilidade de sua futura aplicação no monitoramento ambiental. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que estes contaminantes estejam promovendo a indução na expressão de outros genes biomarcadores não analisados no presente estudo.

Genes *CYP* de *Mytilus edulis*, com alta identidade para as famílias 3 e 26 de vertebrados também foram avaliados ao nível de expressão órgão-específica e indução pelos mesmos contaminantes citados anteriormente. Em humanos, a família CYP3 possui quatro membros, sendo que as isoformas CYP3A4 e CYP3A5 representam, dentre todos os 57 CYPs de humanos, as mais abundantemente expressas ao nível protéico em fígado, trato gastrointestinal, e metabolizam mais de 120 fármacos, frequentemente prescritos, e substratos endógenos como os esteróis, ácido araquidônico, ácidos biliares, vitamina D e metabólitos secundários de plantas (NEBERT; RUSSEL, 2002; VERSLYCKE; GOLDSTONE; STEGEMAN, 2006). Estima-se que entre 40–60 % de fármacos usados em humano, sejam metabolizados por esses CYP3A (GUENGERICH, 1999). As outras duas isoformas, CYP3A43 e CYP3A7, não possuem função conhecida. A expressão desta família é induzida no fígado e intestino por uma grande diversidade de drogas, que apresentam as mais variadas estruturas. A base molecular para esta regulação se dá por um fator de transcrição denominado receptor pregnano X (PXR), que possui afinidade de ligação a uma grande variedade de drogas. Quando ativado o receptor PXR é translocado para o núcleo e ativa a expressão gênica de *CYP3A*. Além do PXR, outro receptor, denominado receptor androstano constitutivo (CAR) também ativa *CYP3A* por um mecanismo semelhante (NEBERT; RUSSEL, 2001).

Em insetos, os genes similares a *CYP3*, estão agrupados nas famílias *CYP6* e *CYP9*. Várias evidências mostram que isoformas específicas de *CYP6* de insetos são induzidos por xenobióticos, drogas, ecdisteróides e estão envolvidos na resistência de insetos, uma vez que são superexpressos em linhagens metabolicamente resistentes a inseticidas organofosforados e carbamatos. Por exemplo, CYP6A2 de inseto expresso de forma heteróloga possui a capacidade de metabolizar os inseticidas heptacloro e aldrin por epoxidação, e diazinon por desulfuração. CYP9 é induzido por produtos secundários de planta e outros xenobióticos (SNYDER, 2000). Portanto é provável que uma possível indução de genes *CYP3-like*, e importantes funções endógenas e relacionadas a detoxificação estejam presentes em outros invertebrados.

No presente estudo, a expressão de *CYP3-like* foi maior em glândula digestiva do que na maioria dos outros órgãos, seguida dos palpos labiais. A distribuição órgão-específica para os três genes *CYP3-like* de *M. edulis*, foi bastante similar, com maiores níveis em palpo labial, glândula

digestiva e margem do manto; níveis intermediários em gônada, músculo adutor e pé; e níveis mais baixos em brânquias.

Uma análise das funções conhecidas associadas ao palpo labial, um órgão ainda pouco estudado, se tratando de respostas toxicológicas, pode auxiliar na investigação a respeito da função destes genes/proteínas *CYP3-like* neste órgão. Em relação a doenças e defesas imunológicas, é sabido que o palpo labial é uma importante porta de entrada para alguns patógenos, como por exemplo o protozoário *Marteilioides chungmuensis* (TUN et al., 2008) e patógenos virais norovírus e poliovírus (MCLEOD et al., 2009) na ostra *C. gigas*. Os palpos labiais também são órgãos com maior quantidade de glicosamino-glicanas, sulfato de heparina, histamina e células similares a mastócitos, o que sugere uma importância deste órgão na defesa contra infecções (ULRICH; BOON, 2001; SANTOS et al., 2002). Quanto a alimentação, juntamente com as brânquias, o palpo labial tem um papel importante na seleção de partículas obtidas na alimentação (DUTERTRE et al., 2007; BENINGER et al., 2008), porém a seleção de partículas maiores do que a abertura plical é exclusivamente atribuída ao palpo labial e não às brânquias (BENINGER et al., 2008). Além disso, a habilidade de produzir muco, possivelmente compostas por proteoglicanas, para formação das chamadas “pseudo-feses” em bivalves, também são atribuídas a este órgão (BENINGER; VENIOT; POUSSART, 1999). Além da importância para a produção de pseudo-feses, é sabido que o muco secretado em outros invertebrados filogeneticamente relacionados, como por exemplo poliquetas (anelida), pode ter uma função de proteção ao estresse oxidativo (MORAES et al., 2006). Do ponto de vista ecológico, Dutertre et al. (2007) sugerem uma correlação positiva entre a área do palpo labial (porém não nas brânquias) com a turbidez das água onde são encontradas as populações de *C. gigas*.

Tendo em vista a maior expressão dos três genes *CYP3-like* no palpo labial e da possível importância deste órgão nas defesas para xenobióticos e patógenos (ver acima), o presente estudo sugere a investigação dos palpos labiais como um possível órgão alvo para estudos ecotoxicológicos utilizando moluscos bivalves, além de órgãos como as brânquias e a glândula digestiva, tradicionalmente analisados em estudos toxicológicos em bivalves.

Quanto ao teste de indução dos genes *CYP3-like* de *M. edulis*, por substâncias agonistas do receptor AHR de vertebrados, foi observada uma indução na expressão gênica de *CYP3-like* (a) e

CYP3-like (b) em brânquias, em animais tratados com BNF. BNF é um flavonóide sintético classicamente utilizado como agonista modelo para estudos da ativação do receptor AHR em vertebrados e, portanto, representa um indutor de CYP1A de vertebrado (JONSSON et al., 2007b). A afinidade de BNF por receptores nucleares de invertebrados, ou o seu efeito na indução de CYPs em invertebrados, não está bem caracterizado na literatura. Em vertebrados, o principal mecanismo de indução de CYP3 envolve a ativação do receptor PXR. Porém, o sítio de ligação de PXR é altamente variável entre espécies, mesmo entre os vertebrados, possuindo afinidades diferentes para compostos específicos (EKINS et al., 2008). Estudos sugerem que o PXR em invertebrados primitivos tais como os cefalocordados (tunicados), possui uma limitação muito maior no número de possíveis agonistas, e possui uma afinidade pelo ligante FICZ, um potente agonista endógeno do receptor AHR em vertebrados superiores (EKINS et al., 2008). A existência ou caracterização de PXR em moluscos não é conhecida, mas tendo em vista o que foi exposto acima, a possibilidade de semelhanças estruturais do sítio de ligação com PXR de vertebrados é remota. Em insetos genes *CYP3-like* (ex.: *CYP6* e *CYP9*) são induzíveis por classes distintas de compostos (ex.: inseticida heptacloro e fenobarbital). Porém, os receptores nucleares envolvidos nestas induções não são conhecidos. O possível envolvimento de outros receptores nucleares na indução de respostas de CYP em molusco, como por exemplo, PPAR e CAR, também não pode ser descartada.

Outro gene estudado em *M. edulis*, foi um *CYP26-like*. Tanto o padrão de expressão gênica órgão-específica, como a indução por agonistas do receptor AHR, foram bastante semelhantes aos genes *CYP3-like (a)* e *CYP3-like (b)*. Tal resposta sugere semelhanças na regulação destes genes, o que é bastante interessante, tendo em vista que são genes que possuem funções bem distintas em vertebrados. A família 26 possui um importante papel na degradação de ácido retinóico (RA), que por sua vez possui um papel sinalizador no desenvolvimento embrionário e no ciclo celular, por ligar-se aos receptores nucleares RAR e RXR, e conseqüentemente modulam uma variedade de outros genes (SAKAI et al., 2001). No invertebrado *Ciona* (tunicado) um gene *CYP26* homólogo foi identificado e apresenta padrões de expressão durante o desenvolvimento e indução por RA que sugere funções semelhantes às descritas em vertebrados (NAGAMOTO; FUJIWARA, 2003). Recentemente, um homólogo de *CYP26* foi também identificado no genoma do molusco gastrópode *L. gigantea*,

juntamente aos genes *Raldh* e *RXR*, o que sugere a presença em protostômios de uma maquinaria celular relacionada ao metabolismo de RA também presente em protostômios (ALBALAT; CANESTRO, 2009). Além disso, PCB77, um agonista do receptor AHR pode interagir de diferentes maneiras na homeostase de ácidos retinóicos (ARUKWE; NORDBO, 2008). Estudos futuros com o presente gene identificado e caracterizado em *M. edulis* poderão identificar outros compostos indutores de *CYP26-like* nesta espécie, assim como elucidar os mecanismos de regulação envolvidos e sua importância para estudos toxicológicos e fisiológicos.

Em suma, os resultados apresentados reforçam a existência de diferenças marcantes nos mecanismos de indução, e possivelmente no metabolismo associado ao sistema CYP em espécies filogeneticamente distantes, como por exemplo, moluscos, insetos, tunicados e vertebrados. Portanto é necessário que mais estudos do sistema CYP como um todo sejam realizados em organismos específicos, como por exemplo, em moluscos bivalves. A extensão do presente estudo, para uma caracterização deste sistema potencialmente irá indicar tanto CYPs que são regulados por uma ampla variedade de contaminantes, como CYPs que são regulados por contaminantes específicos. O conhecimento obtido através de tais estudos poderá contribuir na elucidação, não apenas da existência de novos biomarcadores de contaminação aquática, como também importantes mecanismos fisiológicos ainda não conhecidos destes organismos de importância econômica, social e ambiental.

7.6. CONCLUSÕES

- Cerca de 113 sequências expressas de citocromo P450 (CYP) em moluscos bivalves dos gêneros *Mytilus* e *Crassostrea* foram identificadas em bancos de ESTs e o estudo filogenético de 58 sequências de *M. californianus* sugere a existência de uma expansão do Clan 2, mostrando um padrão semelhante ao observado na diversificação do sistema CYP de vertebrados;
- Novos genes *CYP1-like*, *CYP-3 like* e *CYP26-like* foram identificados em *M. edulis* e suas sequências completas demonstraram identidade relativamente alta (de 28% a 40 %) com famílias de CYPs de vertebrados. A identificação destes genes permitiu a avaliação quantitativa dos mesmos através de PCR em tempo real, representando um primeiro passo na solução de um problema histórico relacionado a tentativa da quantificação de CYPs (principalmente CYP1) em bivalves.
- A expressão dos genes *CYP1-like* apresentaram um padrão órgão-específico similar ao observado para *CYP1A* de vertebrados, com maior expressão em glândula digestiva, um órgão que compartilha algumas semelhanças funcionais ao fígado de vertebrados. Por outro lado, diferentemente de vertebrados, os genes *CYP1-like* não foram induzidos por substâncias agonistas do receptor AHR de vertebrados;
- Os genes *CYP3-like* e *CYP26-like* mostraram uma distribuição de expressão órgão-específica semelhantes, apesar das famílias similares em vertebrados possuírem funções bem distintas. Diferentemente dos genes *CYP1-like*, as duas isoformas de *CYP3-like* e uma de *CYP26-like* são aparentemente induzidas pelo agonista do receptor AHR betanaftoflavona em brânquias de *M. edulis*;

- Uma maior expressão dos genes *CYP3-like* e *CYP26-like* em palpos labiais sugerem alguma importância destes CYPs neste órgão de moluscos bivalves. A maioria dos estudos de ecotoxicologia com moluscos bivalves utiliza os órgãos brânquia e glândula digestiva. O provável envolvimento dos palpos labiais nas defesas para xenobióticos e sua importância ecotoxicológica para estes organismos devem ser melhor investigados em estudos futuros.

8. Capítulo III

Identificação e caracterização de novos genes de citocromos P450 da família 1 (CYP1) em peixes utilizados como modelo em estudos ambientais (*Fudulus heteroclitus* e *Poecilia vivipara*).

8.1. INTRODUÇÃO

8.1.1. Características do peixe *Fundulus heteroclitus* (Linneus, 1766)

A sistemática do peixe *Fundulus heteroclitus* está relacionada abaixo:

Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Cyprinodontiformes
Família	Fundilidae
Gênero	Fundulus
Espécie	<i>Fundulus heteroclitus</i>

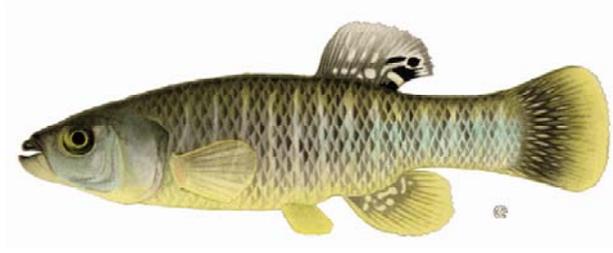


Figura 24. O peixe *Fundulus heteroclitus*

O peixe teleósteo *Fundulus heteroclitus* (Figura 24), também conhecido popularmente como killifish, tem sido largamente utilizado como organismo modelo em estudos ambientais no hemisfério Norte-Americano por ser uma das espécies mais abundantes em regiões estuarinas da Costa Atlântica da América do Norte (BURNETT et al., 2007; MATSON et al., 2008). Além disso, possui pequeno tamanho, desenvolvimento rápido, tolerância para condições diversas e resistência para sobreviver em locais com altos níveis de contaminação. Nos Estados Unidos, habitam muitos dos locais denominados *Superfund Sites* que estão na Lista de Prioridade Nacional da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA). O killifish também é frequentemente utilizado em estudos toxicológicos, incluindo estudos de toxicologia no desenvolvimento embrionário e de carcinogênese (BURNETT et al., 2007).

8.1.2. Características do peixe *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider, 1801)

A sistemática do peixe *Poecilia vivipara* está relacionada abaixo:

Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Cyprinodontiformes
Família	Poeciliidae
Gênero	Poecilia
Espécie	<i>Poecilia vivipara</i>



Figura 25. O peixe *Poecilia vivipara*

O peixe *Poecilia vivipara* (Figura 25) ocorre ao longo de toda a costa brasileira. Esta espécie é resistente a variações ambientais (ex.: temperatura e salinidade), possui populações não migratórias e está amplamente distribuída em ambientes lânticos salinos na América do Sul, Costa Atlântica, representando um modelo potencial para estudos ambientais (GOMES; MONTEIRO, 2008). Além disso, *P. vivipara* é uma espécie filogeneticamente próxima ao killifish *Fundulus heteroclitus*, estabelecido há aproximadamente três décadas como o primeiro peixe modelo para estudos ambientais na América do Norte, o que possibilita a realização de estudos comparativos com esta espécie já bem estudada (ex.: STEGEMAN, 1978; MATSON et al., 2008).

8.1.3. Citocromos P450 da família 1 (CYP1)

As enzimas citocromo P450 (CYP) catalisam o metabolismo oxidativo de milhares de drogas, xenobióticos, e moléculas endógenas. Contaminantes ambientais, como os hidrocarbonetos halogenados, PAHs, herbicidas e pesticidas estão entre os muitos substratos de CYP1s de mamíferos

(CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1) (NEBERT; RUSSEL, 2002) e CYP1As de peixes (SCHOBER et al., 2006). Enquanto o metabolismo geralmente resulta em detoxificação do contaminante, a ação das enzimas CYP1 também pode gerar metabólitos tóxicos que contribuem para o aumento do risco de câncer, deformações embrionárias e outros efeitos tóxicos (NEBERT; KARP, 2008). Estas características levaram ao amplo uso da expressão de genes *CYP1A* como um marcador de exposição ambiental para contaminantes agonistas do receptor AHR em humanos e vida selvagem (STEGEMAN; KLOPPER-SAMS; FARRINGTON, 1986; FUJITA et al., 2001; LAMBERT et al. 2006). Em peixes, a indução de CYP1A tem sido amplamente utilizada como um marcador da exposição a contaminantes há mais de três décadas (ex.: STEGEMAN, 1978; STEGEMAN, 1986).

A expressão do CYP1A1 em mamíferos e de CYP1As em peixe podem ser fortemente induzidas por PAHs, PCBs, dibenzo-p-dioxinas (PCDD) e dibenzofuranos (PCDF) e alguns produtos naturais, via ativação do receptor AHR (HAHN, 2002). No início dos anos 70, foi observado que hidrocarbonetos halogenados já haviam se espalhado por praticamente todos os componentes do ecossistema global, incluindo ar, água, sedimentos aquáticos, peixes, vida selvagem e seres humanos (SAFE, 1995). Tais compostos foram denominados poluentes orgânicos persistentes (POPs), e vários esforços internacionais vêm sendo realizados na tentativa de eliminar e/ou reduzir a emissão e descarte destes compostos, como por exemplo, o Fórum Internacional de Segurança Química promovido pela UNEP (1997) e a Convenção de Estocolmo (2001) (PEREIRA, 2004). Estes compostos estão entre os contaminantes mais relevantes, não apenas pela sua acumulação e biomagnificação na cadeia trófica, como também pela alta toxicidade. Apesar da produção industrial em larga escala dos PCBs e PCDD/Fs ter sido banida há décadas, estas substâncias também podem ser produzidas por outros processos, tais como pela incineração de diversos materiais e queima de combustíveis, o que faz com que ainda representem risco à biota, o que justifica a necessidade de uma atenção especial no monitoramento destes compostos no ambiente (PEREIRA, 2004).

A indução de CYP1 em peixes pode ser avaliada a nível protéico utilizando anticorpos específicos ou por análise de cinética enzimática, como por exemplo, pela atividade da enzima etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) (PINA; CASADO; QUIROS, 2007). Recentemente, a identificação e caracterização de genes CYP1A têm sido realizada em diversas espécies de peixes,

possibilitando a avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (PINA; CASADO; QUIROS, 2007). Apesar da indução na expressão do gene nem sempre estar correlacionada com os níveis de proteína detectados, no caso do gene *CYP1A*, existe uma forte correlação entre a indução da expressão gênica e um aumento na atividade da EROD em animais expostos a contaminantes (PINA; CASADO; QUIROS, 2007). Tal constatação, aliada ao fato de que há uma maior sensibilidade utilizando-se a expressão gênica ao invés da análise de atividade e nível protéico (PINA; CASADO; QUIROS, 2007), dá suporte a utilização destas metodologias, e potencialmente, de substituição dos métodos clássicos.

Os estudos com contaminantes indutores de CYP1, assim como a maioria dos estudos de toxicidade e avaliação de risco, geralmente avaliam o efeito de compostos isolados. Porém no ambiente, a maioria dos poluentes são lançados em forma de misturas simples e complexas de substâncias químicas, que podem variar ou não em sua constituição (SEN; MAHADEVAN; DEMARINI, 2007). Estudos recentes, utilizando microarranjos para avaliar a indução simultânea de milhares de genes frente à exposição de animais a misturas complexas de contaminantes ambientais, mostraram que os genes *CYP* da família 1 estão entre os poucos que são induzidos por todas as misturas complexas testadas (SEN; MAHADEVAN; DEMARINI, 2007). Estas misturas incluíam fumaça de cigarro, emissões por queima de combustível diesel, ar urbano, emissões de descarga de motocicleta, pigmento *carbon black*, combustível de avião, metal mineral e fumaça. Este estudo demonstra que tais misturas podem ser tóxicas para seres humanos e ratos, e que os *CYP1s* são bons biomarcadores não só para contaminantes isolados, como por exemplo, no caso dos POPs, mas também para misturas ambientais de compostos químicos frequentemente encontrados em locais poluídos (SEN; MAHADEVAN; DEMARINI, 2007).

Diferentemente de mamíferos que possuem dois genes *CYP1As* e um gene *CYP1B1*, a maioria das espécies de peixes possuem apenas um gene *CYP1A* e um gene *CYP1B1* (GOLDSTONE et al., 2007). Peixes também apresentam dois *CYP1Cs*, os parálogos *CYP1C1* e *CYP1C2* (GODARD et al., 2005). Assim como a *CYP1A* e *CYP1B1*, os *CYP1Cs* são induzidos em diferentes graus por agonistas de AHR em peixe-zebra (JONSSON et al., 2007a b). Recentemente, foi identificado um quinto gene em teleósteos, *CYP1D1* (GOLDSTONE et al., 2009). Os genes *CYP1D1* e *CYP1A* em peixe-zebra

compartilham uma alta porcentagem de identidade e estrutura gênica. Apesar disso, os potentes agonistas do receptor AHR, PCB126 e TCDD, não são capazes de induzir a transcrição deste gene em peixe-zebra, o que sugere o envolvimento de outros receptores em sua regulação. A proteína CYP1D1 é expressa em fígado de peixe-zebra e a proteína recombinante CYP1D1 é cataliticamente ativa para o substrato etoxiresorufina, apesar de que em níveis significativamente menores que CYP1A (GOLDSTONE et al., 2009). É possível que diferentes substâncias químicas e/ou diferentes receptores estejam envolvidos na regulação dos cinco *CYP1s* em peixes. Além disso, os CYP1s devem apresentar diferentes especificidades para substratos distintos.

Até o presente momento, somente em peixe-zebra os cinco CYP1s foram examinados em detalhe, espécie esta que possui o genoma completo identificado. O presente trabalho procurou verificar se o mesmo grupo de genes *CYP1s* existem, e são similarmente regulados no killifish *F. heteroclitus*. A regulação da atividade CYP1A tem sido estudada em *F. heteroclitus* há aproximadamente 30 anos (ex.: STEGEMAN, 1978) e o gene *CYP1A* foi clonado há uma década nesta espécie (MORRISON et al., 1998). Recentemente, *CYP1C1* também foi clonado em *F. heteroclitus* (WANG; SCHEFFLER; WILLETT, 2006).

No presente trabalho, foram identificadas e clonadas as sequências completas de três novos genes: *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* em *F. heteroclitus*. A expressão basal e a regulação pelo agonista do receptor AHR, PCB126, foi avaliada em diferentes órgãos para o grupo de genes *CYP1s* neste peixe (*CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*). Comparações entre populações de *F. heteroclitus* provenientes de duas regiões com diferentes históricos de contaminação por PCB, também foram realizadas e sugerem que existam possíveis adaptações nestes peixes envolvendo estes genes.

Em complementação ao estudo realizado com a espécie de peixe norte-americano *F. heteroclitus*, uma espécie filogeneticamente próxima que ocorre na costa brasileira, e recentemente proposta como possível modelo ambiental para estudos de ecotoxicologia aquática, o peixe *Poecilia vivipara*, foi escolhido para identificação dos genes mais sensíveis para a indução por contaminantes agonistas do receptor AHR. Foram identificados os novos genes *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1* em *P. vivipara*, que poderão ter aplicabilidade para o monitoramento desta classe de substâncias em estudos ambientais na zona costeira do Brasil.

8.2. OBJETIVOS

- Identificar e caracterizar filogeneticamente os genes de citocromos P450 da família 1 *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* no peixe *Fundulus heteroclitus*;
- Caracterizar os níveis de expressão gênica órgão-específicos para os genes *CYP1s* de *F. heteroclitus* (*CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*);
- Verificar os níveis de indução dos genes *CYP1s* de *F. heteroclitus* para o contaminante PCB126;
- Comparar os níveis de expressão gênica de *CYP1s* em duas populações de *F. heteroclitus* provenientes de locais com diferentes históricos de contaminação;
- Avaliar a expressão dos genes *CYP1s* para PCB126 em duas populações de *F. heteroclitus*;
- Identificar genes *CYP* da família 1, sensíveis a contaminantes agonistas do receptor AHR na espécie de peixe que ocorre no Brasil *Poecilia vivipara*.

8.3. MATERIAIS E MÉTODOS

8.3.1. Coleta, aclimação e exposição de *Fundulus heteroclitus* em laboratório

Killifish *Fundulus heteroclitus* machos, com 3 a 5 g de massa corporal, foram coletados em Scorton Creek (SC) e New Bedford Harbor (NBH), Massachusetts, USA, (n~40 de cada local) em Maio de 2008. Os peixes foram levados ao biotério aquático do Laboratório Redfield no Instituto Oceanográfico de Woods Hole, Massachusetts, USA (WHOI) onde foram mantidos a 20 °C em água marinha corrente e alimentados duas vezes por dia com ração Omega One Freshwater Flakes™. Um dia após a coleta de campo, peixes provenientes de cada local (n=12 por local) foram mortos por transecção cervical e o fígado foi retirado e conservado para extração de RNA e síntese de cDNA. As carcaças destes peixes foram congeladas a -20°C para posterior determinação da concentração de congêneres de PCBs. O restante dos peixes permaneceu por um mês nas condições de aclimação mencionadas acima, antes do experimento de exposição em laboratório.

Vinte peixes proveniente de SC foram transferidos do biotério aquático, para dois aquários de 10 l (n=10 por aquário), com água recirculante e aeração constante. Após aclimação de 24 horas os peixes de um dos aquários foram pesados individualmente e injetados intraperitonealmente com PCB126 dissolvido em DMSO na dose 31 pmol/g de peixe (10 ng/g de peixe) (grupo tratado). Peixes de outro aquário foram injetados com um volume equivalente de DMSO (grupo controle). Paralelamente, os procedimentos de aclimação e tratamento com PCB126/DMSO foram realizados da mesma forma nos peixes da população proveniente de NBH, totalizando quatro grupos experimentais (tratado e controle provenientes de SC; tratado e controle provenientes de NBH). Os peixes foram mortos 48 h após a injeção e o fígado (n=10), brânquia (n=8), intestino, coração, rim, olho, cérebro e testículo (n=4) foram retirados e conservados em RNA later (Qiagen).

A escolha da dose de PCB126 e o tempo de exposição utilizados nesse experimento foram determinados com base em estudos prévios realizados no laboratório do Dr. John J. Stegeman, como uma dose capaz de causar indução da expressão da proteína/atividade catalítica de CYP1A sem causar efeitos adversos como mortalidade (dados não publicados). A utilização desta dose e tempo de exposição para indução de CYP1A em peixe, também estão baseadas na literatura através de estudos

realizados com outras espécies de peixe (TUGIYONO; GAGNON, 2002; KIM et al., 2008). Tanto o experimento de exposição em laboratório, como as análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório do Dr. John J. Stegeman, WHOI, Massachusetts, USA. As análises químicas de PCBs foram realizadas pela Agência de Proteção Ambiental Norte America (EPA). Os procedimentos usados no experimento foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal do Instituto Oceanográfico de Woods Hole.

8.3.2. Caracterização dos locais de coleta e análise PCBs em *F. heteroclitus*

SC e NBH têm sido utilizados como local referência e poluído, respectivamente, para estudos ambientais com *F. heteroclitus* há vários anos (BELLO et al., 2001) (Figura 26). Dentre os vários contaminantes presentes em NBH (ex.: PCBs, metais e PAHs) decorrente de décadas de atividades industriais e portuárias, os PCBs são apontados como a classe de contaminante com maior potencial para causar efeitos tóxicos em organismos aquáticos deste local (HO et al., 1996). Em algumas regiões específicas de NBH as concentrações de PCBs nos sedimentos chegaram a concentrações extremamente altas (100 mg de PCBs/g de sedimento), fazendo com que este local fosse colocado na Lista de Prioridade Nacional da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) como um *Superfund Site* no ano de 1983 (BERGEN et al., 2005).

Vinte e dois congêneros de PCBs foram analisados na carcaça de três peixes coletados em SC e NBH de acordo com metodologia descrita previamente por Jayaraman, Pruell e McKinney (2001) e Gutjahr-Gobell et al. (1999). Os congêneros não-orto substituídos, potentes agonistas do receptor AHR (PCB 77, PCB 81, PCB 126 and PCB 169), assim com outros dezoito congêneros (PCB 8, PCB 18, PCB 28, PCB 44, PCB 52, PCB 66, PCB 101, PCB 105, PCB 118, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 170, PCB 180, PCB 187, PCB 195, PCB 206 and PCB 209) foram analisados nos laboratórios da EPA.

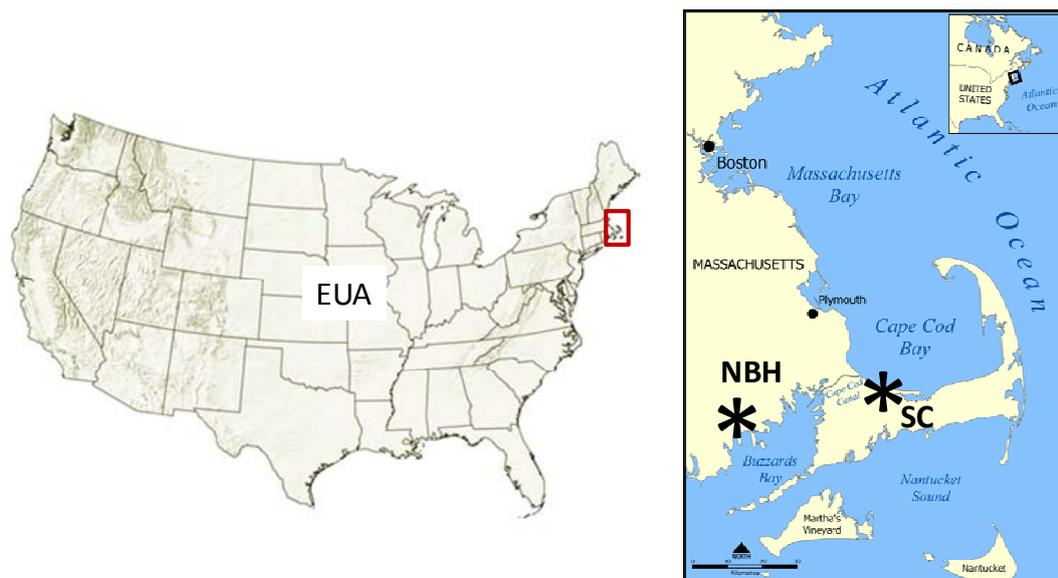


Figura 26. Mapa mostrando a localização de Scorton Creek (SC) e New Bedford Harbor (NBH), Massachusetts, USA, onde foram coletadas distintas populações de peixes *F. heteroclitus*. NBH é um local historicamente contaminado por PCBs, enquanto SC foi escolhido como um local referência por apresentar baixos níveis de contaminação.

8.3.3. Identificação e clonagem de novos genes CYP1s em *F. heteroclitus*

Fígado, cérebro e olho foram dissecados de um peixe proveniente de SC escolhido aleatoriamente. RNA total foi isolado utilizando-se o kit AurumTM RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) o qual inclui eliminação de DNA genômico por tratamento com DNase. A qualidade e quantidade de DNA foram determinadas espectrofotometricamente (Nanodrop ND1000; NanoDrop Technologies). O cDNA foi sintetizado a partir de 2µg de RNA, utilizando-se o Kit Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen Inc.), iniciadores anchor oligo(dT) (MWG Biotech Inc.) e inibidor de Rnase (Promega Corp.). Cerca de dez pares (senso e antisenso) de iniciadores degenerados foram desenhados usando regiões conservadas de *CYP1B1* e *CYP1D1* e evitando regiões conservadas presentes em outras subfamílias de CYP. As sequências de *CYP1B1* e *CYP1D1* utilizadas haviam sido identificadas e anotadas previamente pelo grupo de pesquisa do Dr. John J. Stegeman, e previamente obtidas nos genomas dos peixes medaka *Oryzias latipes*, Stickleback *Gasterosteus aculeatus*, pufferfish *Fugu rubripes* e peixe-zebra *Danio rerio*. O programa utilizado para as reações de PCR foi similar para todos os primers testados: 1 ciclo de denaturação inicial (30s; 90°C); 40 ciclos com denaturação (30s; 90 °C), anelamento (45s; 40°C, 45°C, 50°C e 55°C), extensão (1min-72°C) e

manutenção a 4°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose, purificados, ligados no vetor *pGEM-T Easy Vector* (Promega) e transformados em bactérias *E. coli* (TOP10 Kit, Invitrogen). Plasmídeos foram purificados de culturas de colônias positivas (QiaPrep, Qiagen) e sequenciados. Iniciadores que detectaram fragmentos dos genes *CYP1B1* e *CYP1D1* são mostrados na Tabela 18. O terceiro novo gene *CYP1* identificado nesse trabalho, *CYP1C2*, foi obtido inicialmente de um fragmento do GenBank.

As extremidades 5' e 3' dos genes *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* foram obtidas utilizando o kit BD Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) utilizando os iniciadores específicos desenhados com base nas instruções do fabricante, e apresentados na Tabela 19. Amostras de cDNA de cérebro foram utilizadas na identificação de *CYP1B1* e *CYP1C2*, e amostras de cDNA de fígado para *CYP1D1*, e a escolha foi baseada em níveis significativos de expressão destes genes observados para estes órgãos em um estudo realizado anteriormente em peixe-zebra (JONSSON et al., 2007 b; GOLSTONE et al., 2009).

Tabela 18. Iniciadores degenerados desenhados e utilizados na clonagem e sequenciamento de *CYP1B1* e *CYP1D1* em *F. heteroclistus*.

iniciador	Sequência 5' - 3'	Localização no gene
CYP 1B1_senso	GCBGGSAGCATCGTGGACGTG	374 - 394
CYP 1B1_antisenso	TTGGACAGCTCCTCDDCRATGCA	1058 - 1080
CYP 1D1_senso	GRATGAAYGGATTCATGGAGCGCA	947 - 970
CYP 1D1_antisenso	GGTGCYBAGATCCAGCTBCTGACC	1627 - 1650

Tabela 19. Iniciadores desenhados para amplificação das terminações 5' e 3' dos genes *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* utilizando o kit BD Smart™ RACE cDNA Amplification. A localização de anelamento dos primers no gene foi estimada com base nas sequências depositadas no genbank, número de acesso FJ786959, FJ786960 e FJ786961, respectivamente.

iniciador	Sequência 5' - 3'	Localização no gene 5' - 3'
1B1 3' senso1	ATATTTGGAGCCAGCCAGGACACG	629 - 652
1B1 3' senso2	CTGCCGTACGTCATGGCCATC	782 - 805
1B1 5' antisenso1	CCACCGAGAAGATGAGCACGTTG	1024 - 1046
1B1 5' antisenso2	TCAAATGTCTCCGGGTTGGACCAC	949 - 972
1C2 3' senso1	GCAACGGTGGCAGATTTGATCGGCGCAGGC	1121 - 1150
1C2 3' senso2	TGACAGGGTGGTGGGGAGAGGCAGGC	1237 - 1262
1C2 5' antisenso1	TGAGGGTCCCTCCACCTCAGGGGGTTCGTG	1442 - 1470
1C2 5' antisenso2	GGGGGATGGTGCAGGGACGAAGCCGGT	1331 - 1358
1D1 3' senso1	GCGCAGGATCCAGGAACACATCAAC	966 - 990
1D1 3' senso2	GGGTTGCAGTGGAGCCTGTTGTACCT	1147 - 1172
1D1 5' antisenso1	CATCTCCAAACGTGCGACTCCATCC	1551 - 1575
1D1 5' antisenso2	GTCTCTTGTGGTGCAGTGAGGGATGG	1328 - 1353

8.3.4. Identificação e clonagem de novos genes *CYP1s* em *P. vivipara*

Iniciadores degenerados foram desenhados para *CYP1A* e *CYP1C1* seguindo a mesma metodologia descrita para identificação de *CYP1s* em *F. heteroclitus*. Para detecção da sequência de *CYP1B1*, foram utilizados os mesmos iniciadores utilizados previamente em *F. heteroclitus*. Iniciadores que detectaram fragmentos de tamanho esperado para os genes *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1D1* estão mostrados na Tabela 20. Os produtos de PCR foram separados, clonados e sequenciados para confirmação da identidade do gene como descrito previamente.

Tabela 20. Iniciadores degenerados utilizados na amplificação de fragmentos de cDNA de *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1* em *P. vivipara*.

Iniciador	Sequência 5' - 3'
Poe_1A_senso	YCCTATCATTGGGAATYTWCTGGAG
Poe_1A_antisenso	TCTGTRATGTCACGGATGTTGTCC
Poe_1B1_senso	GCBGGSAGCATCGTGGACGTG
Poe_1B1_antisenso	TTGGACAGCTCCTCDCCRATGCA
Poe_1C1_senso	CAGCTGGGYCAGATGCCTCAC
Poe_1C1_antisenso	TCTGTCCTCSACWGACGGCAGYCG

8.3.5. Análises filogenéticas de novos genes *CYP1s* em *F. heteroclitus* e *P. vivipara*

As sequências completas dos genes de *F. heteroclitus* (contendo a região codificante completa) foram traduzidas e alinhadas com outras sequências CYP1 de peixe. Regiões de alinhamento incerto foram excluídas das análises filogenéticas (KREIL; OUZOUNI, 2003). Árvores filogenéticas foram construídas usando métodos de *maximum likelihood* (RaxML 7.0.3; STAMATAKIS, 2006) e Bayesianos (MrBayes 3.1.2; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). O suporte numérico para cada ramo foi obtido por análise de *bootstrap* (100 replicatas e $3 \cdot 10^{-6}$ gerações, para *maximum likelihood* e Bayes, respectivamente).

Domínios funcionais putativos, como por exemplo, regiões de reconhecimento de substrato, foram avaliados por similaridade de sequências de domínios CYP1 de outras espécies. As similaridades nas sequências de aminoácido entre os CYP1s foram plotadas utilizando GCG (v. 10.3; Accelrys, San Diego, CA). Escores de similaridade foram calculados usando uma matrix de similaridade de aminoácidos BLOSUM62 (HENIKOFF; HENIKOF, 1992).

As sequências parciais dos genes *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1* de *P. vivipara* foram traduzidas para sequências de aminoácidos e foi realizada uma busca no GenBank, e também alinhadas com sequências de CYP1s de *Fundulus heteroclitus* para verificação da porcentagem de identidade, o que permitiu uma anotação preliminar dentro das famílias e sub-famílias específicas.

8.3.6. Análise de expressão gênica quantitativa para os *CYP1s* em *F. heteroclitus*

O RNA total foi extraído e cDNA sintetizado como descrito anteriormente. Iniciadores específicos utilizados para análise de expressão gênica quantitativa em tempo real dos genes *CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2*, *CYP1D1* e *ACT* foram desenhados (Primer 3, ROZEN; SKALETSKY, 2000) e estão mostrados na Tabela 21. Experimentos de PCR em tempo real foram realizados utilizando iQ SYBR Green Supermix de acordo com as instruções do fabricante e um sistema de detecção iQ Real-Time PCR (Biorad). Cada amostra foi analisada em triplicata com o seguinte protocolo: 95°C por 30s e 40 ciclos de 95°C por 15s e 62°C por 1min. A análise da curva de fusão foi realizada nos produtos de PCR no final de cada corrida de PCR a fim de garantir que um produto

único fosse amplificado. O método $E^{\Delta Ct}$ foi utilizado para comparar os níveis de expressão dos diferentes *CYP1s* em um dado órgão, e para calcular mudanças em respostas em termos de “vezes de indução” para o tratamento de PCB126 em relação ao grupo controle. A eficiência de reação para cada gene foi calculada usando curvas padrões geradas a partir de diluições (10^2 a 10^9 moléculas) de plasmídeo (pGEM-T Easy Vector) contendo fragmentos de um dado gene alvo (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Jonsson et al.(2007 b) comparou expressão de *CYP1s* órgão-específica utilizando dados normalizados para diferentes genes (ACT e ARNT) com o método $E^{\Delta Ct}$ e constatou inconsistências comparando as duas normalizações. Diferenças órgão-específicas no valor de Ct para ACT e outros genes referência foram constatadas anteriormente em outros estudos (MCCURLEY; CALLARD, 2008). Assim, para comparar os níveis de expressão entre diferentes órgãos, número de moléculas para *CYP1s* e *ACT* foram calculados baseados em curvas padrões. A abundância relativa de transcritos *CYP1* foi determinada por quantidade específica de RNA total para cada grupo usando *ACT* apenas como um controle de eficiência para normalizar amostras individuais dentro de cada grupo (órgão), mas não entre órgãos diferentes.

Tabela 21. Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real para análise da expressão gênica de *CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* em *F. heteroclitus*.

iniciador	sequência 5' - 3'
1A qPCR senso	CTTTCACAATCCCACACTGCTC
1A qPCR antisenso	GGTCTTTCCAGAGCTCTGGG
1B1 qPCR senso	ATATTTGGAGCCAGCCAGGACACG
1B1 qPCR antisenso	CGCACCTGCATCTCAGGGTACTTG
1C1 qPCR senso	TCTGGACGCCTTCATCTACGA
1C1 qPCR antisenso	GTGACGTCCGATGTGGTTGA
1C2 qPCR senso	GCAGGCTGCCATCTGTTGAGGACA
1C2 qPCR antisenso	CGAAGCTGGTGAAACGCATTGTCT
1D1 qPCR senso	CTTTCACCATCCCTCACTGCACCA
1D1 qPCR antisenso	GTCTCCGGATCACCCAAAGATCC
ACT qPCR senso	TGGAGAAGAGCTACGAGCTCC
ACT qPCR antisenso	CCGCAGGACTCCATTCCGAG

8.4. RESULTADOS

8.4.1. Clonagem de três novos genes de citocromo P450 da família 1 (*CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*) em *F. heteroclitus*

A utilização de iniciadores degenerados, desenhados com base em sequências de *CYP1B1* e *CYP1D1* de outros peixes, permitiu a amplificação de sequências parciais de 700 pb em *F. heteroclitus*. O alinhamento da sequência de aminoácidos destes fragmentos com sequências de aminoácido de outros peixes resultou na classificação preliminar dessas novas sequências em *F. heteroclitus* como *CYP1B1* e *CYP1D1*. O alinhamento de *CYP1s* incluiu uma sequência de 588 pb obtida do GenBank (Acesso AF235140) que havia sido anotada anteriormente como *F. heteroclitus CYP1B1*. Apesar disso, o alinhamento desta sequência com outras sequências de *CYP1* indicou que se tratava de um gene *CYP1C2*, ao invés de *CYP1B1*. Esta sequência *CYP1C2* e os outros dois fragmentos clonados (*CYP1B1* e *CYP1D1*) foram utilizados inicialmente para a obtenção da sequência completa destes genes utilizando a técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) e iniciadores específicos. As sequências completas para os novos genes *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* foram depositadas no GeneBank com os números de acesso FJ786959, FJ786960 e FJ786961.

8.4.2. Análise das sequências *CYP1s* em *F. heteroclitus*

A região codificante para os três novos genes resultaram em proteínas traduzidas de 537, 524 e 535 aminoácidos, 10-15 aminoácidos a mais do que as sequências correspondentes em peixe-zebra *CYP1B1*, *CYP1C2*, e *CYP1D1*, respectivamente. As sequências completas de killifish mostraram 61%, 69% e 67% de identidade para *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* de peixe-zebra, respectivamente, aumentando para 69%, 74%, e 75% de identidade quando regiões ambíguas do alinhamento foram mascaradas (Tabela 22). A classificação de CYPs baseada na identidade de aminoácidos sugerida por (NELSON et al., 1996), aceitando identidades maiores do que 55 % para a mesma sub-família, está em concordância com a anotação dos genes sugerida aqui para estas subfamílias.

Análises filogenéticas com as sequências de aminoácidos para os cinco *CYP1s* de *F. heteroclitus* foram realizadas juntamente com membros da família *CYP1* de peixe-zebra e outras

espécies selecionadas, incluindo sequências de CYP1 obtidas nos genomas de medaka e stickleback. A Figura 27 mostra que as sequências de killifish agruparam com CYP1s de outros teleósteos, resultando no agrupamento de CYP1As e CYP1D1s em um clado, e de CYP1B1 e CYP1Cs, em outro. Em todos os casos as sequências de CYP1s de *F. heteroclitus* agruparam mais proximamente com ortólogos de CYP1s de medaka. Diferentemente de estudos anteriores (GODARD et al., 2005; GOLDSTONE et al., 2007; GOLDSTONE et al., 2009), nesta análise os genes CYP1C1 e CYP1C2 de peixe-zebra agruparam entre si, em vez de agrupar com seus respectivos ortólogos de outras espécies, possivelmente devido a aumentos na amostragem taxonômica ou diferenças no mascaramento do alinhamento.

De uma forma geral, os CYP1s de killifish e peixe-zebra exibem altos graus de similaridade na sequência proteica (Figura 28). Apesar disso, esta similaridade varia ao longo da proteína, com a menor similaridade (BLOSUM62-escore) observada na região de ancoramento a membrana, hélice D, e a região de loop desordenada H-I (dados não mostrados). A região de reconhecimento de substrato (SRS) dos CYP1s ortólogos de peixe-zebra e killifish são 74-84 % idênticas, com SRS 2 e 3 mostrando o maior número de diferenças (Figura 28). A comparação das sequências de *F. heteroclitus* CYP1A e CYP1D1 ao longo da proteína mostrou uma marcada semelhança entre CYP1A e CYP1D1 nas SRSs 4 e 5 e uma marcada diferença em SRSs 2 e 3 (Figura 26). Estes resultados são similares às variações encontradas na similaridade das sequências observadas entre CYP1A e CYP1D1 de peixe-zebra (GOLDSTONE et al., 2009).

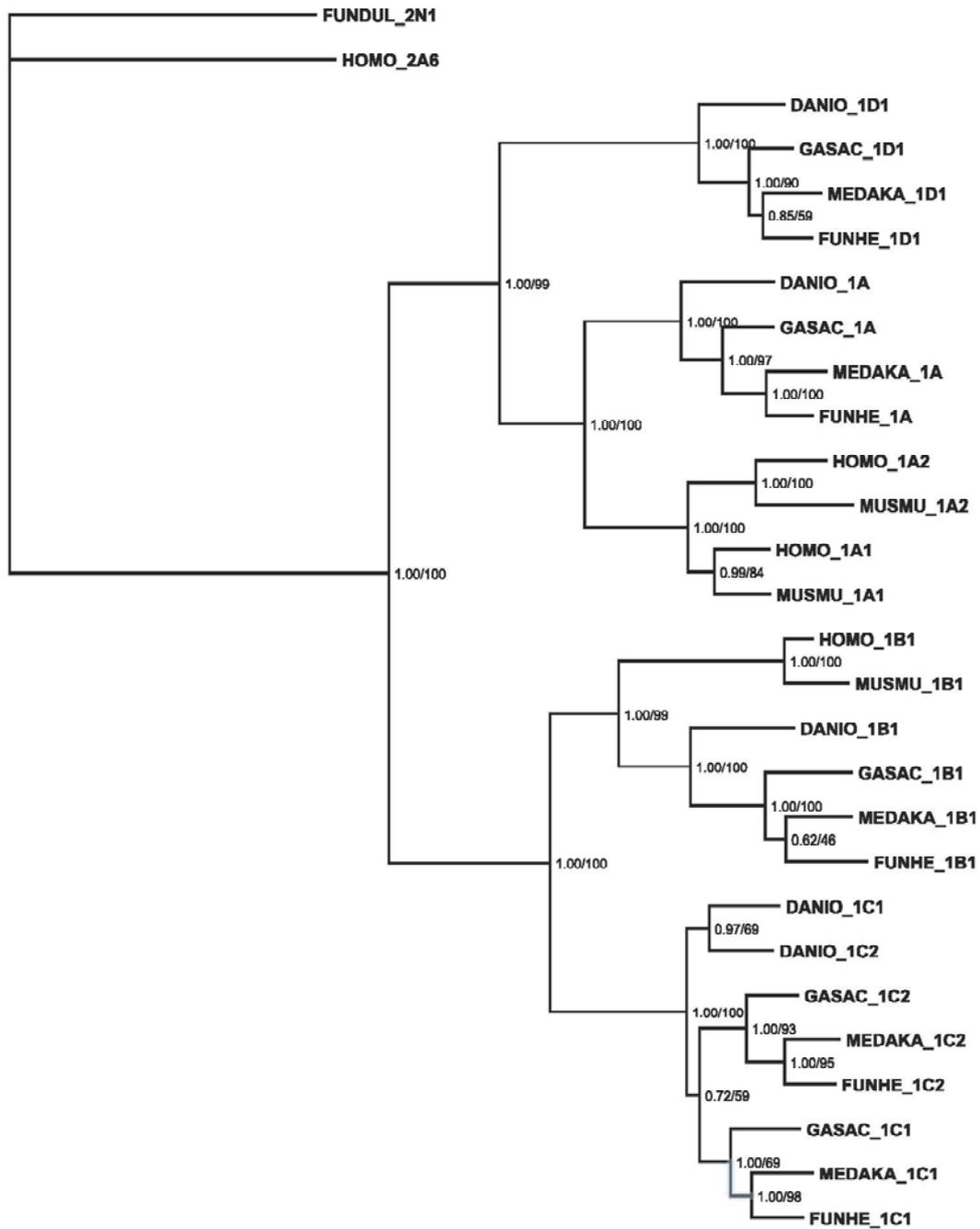


Figura 27. Árvore filogenética de seqüências de CYP1s. Os números nos pontos nodais são valores de suporte derivados de uma análise filogenética Bayesiana e análise de *Maximum likelihood bootstrap* (3×10^6 gerações e 100 replicatas, respectivamente). Seqüências representadas na árvore incluem seqüências anotadas do genoma de medaka (MEDAKA), *stickleback* (GASAC), assim como seqüências previamente publicadas de killifish (FUNHE), peixe-zebra (DANIO), ser humano (HOMO) e camundongo (MUSMU).

Tabela 22– Identidade entre sequências de CYP1 de *Danio rerio* (Dr) e *Fundulus heteroclitus* (Fh). Valores para identidade de aminoácidos são apresentados acima da diagonal e identidade de nucleotídeos abaixo da diagonal da tabela. Regiões de ambiguidade no alinhamento das sequências foram mascaradas para a análise.

	Fh_1A	Dr_1A	Fh_1D1	Dr_1D1	Fh_1B1	Dr_1B1	Fh_1C1	Dr_1C1	Fh_1C2	Dr_1C2
Fh_1A		73%	47%	48%	41%	43%	41%	40%	41%	40%
Dr_1A	70%		48%	48%	42%	43%	42%	42%	41%	41%
Fh_1D1	56%	56%		75%	40%	40%	39%	40%	41%	41%
Dr_1D1	56%	55%	70%		38%	39%	38%	40%	41%	42%
Fh_1B1	50%	51%	52%	48%		69%	53%	56%	53%	55%
Dr_1B1	51%	51%	50%	48%	68%		54%	56%	55%	56%
Fh_1C1	49%	50%	50%	49%	61%	59%		81%	70%	75%
Dr_1C1	49%	50%	50%	51%	60%	60%	72%		73%	83%
Fh_1C2	50%	49%	50%	50%	59%	58%	71%	69%		74%
Dr_1C2	49%	50%	51%	51%	60%	60%	69%	82%	70%	

	SRS1	SRS2	SRS3	SRS4	SRS5	SRS6
FUNHE_1A	GRFDLYSFRFINDGKSLAFSTDKAG	VNLAEDFV	FVNLNRRF	KIVGIVNDLFGAGFDTIST	SSYLPTIPHC	MTEPYGLT
DANIO_1A	...E...TK...S...QV...	...MSDE.G	...LDI.E...F.....	...
FUNHE_1D1	...E.FT.SAVA..T.MT..EKYGF	...INNEVL	...M.QYIH..M	...Q.IHT.I.I.S...IA	...V.....	...LSADF...
DANIO_1D1	...T.SAVAN.T.MT..EKYG.	...HINNEVL	...M.EFI..M	...Q.HS.I.I...I	...A.M.....	...LSSTF...
FUNHE_1B1	...T..KH.SA.R.M..G.-VTD	...GRNDK.T	...KK..QD.	...YVPTIG.I...SQ..L..	...T.FV.L...S	...LDYK...
DANIO_1B1	...FA...VSN...M..GN-YTF	...GRNDQ.T	...KE..KE.	...FVPPTIS.I...SQ..L..	...T.FT.L...S	...DY.....
FUNHE_1C1	...NFV..QM.SG.R..T.TN-YSK	...LQSIDK.G	...KTI.TE.	...FVEAT.T..I...Q..M..	...T.FV...S	...LECS...
DANIO_1C1	...NFV..QM.SG.R..T.TN-YSK	...LGRENK.G	...LQTI.KE.	...FVEST.T..I...Q..V..	...T.FV.V...S	...DCS...A
FUNHE_1C2	...NFV..QNVSG...S.NN-YSK	...LRHVDL.G	...KWS.QE.	...YTEAT.A..I...M..V..	...T.FV.V...L	...LNYS...
DANIO_1C2	...NFV..QYVSG.T.MT.AS-YSK	...LGNVNK.S	...KD...SD.	...HTE.T.S..I...L..V..	...T.FV.V...S	...LNCS...

Figura 28. Alinhamento das regiões de reconhecimento de substrato (SRS1-6) dos CYP1s de *F. heteroclitus* (FUNHE), com as mesmas regiões de *D. rerio* (DANIO). Aminoácidos idênticos a sequência referência (FUNHE_1A) estão identificados por ponto.

8.4.3. Expressão gênica de *CYP1s* em diferentes órgãos de *F. heteroclitus*

Amostras de órgãos de killifish do grupo controle (DMSO), provenientes de SC (local referência), foram avaliadas para caracterização dos níveis basais de expressão dos cinco *CYP1s* em diferentes órgãos, por PCR em tempo real.

A Figura 29 mostra as diferenças nos níveis de expressão dos cinco *CYP1s* em um determinado órgão. A expressão relativa foi calculada e expressa como $\Delta^{ct_{\beta\text{-actin}} - ct_{CYP}}$. *CYP1A* foi o transcrito mais expresso no fígado, coração, rim, intestino, olho e brânquia. No fígado, *CYP1A* foi ~300 vezes mais alto do que *CYP1D1*, ~1.300 vezes mais alto do que *CYP1B1* e ~30.000 vezes mais alto do que *CYP1C2*. No cérebro, *CYP1B1* e *CYP1D1* foram os transcritos mais expressos. *CYP1C1* foi o transcrito mais expresso na gônada, cerca de 1.000 e 3.000 vezes mais alto do que *CYP1A* e *CYP1B1*, respectivamente. *CYP1C2* foi o transcrito de expressão mais baixa entre os genes *CYP1* na maioria dos órgãos examinados (fígado, coração, rim, olho, cérebro e rim).

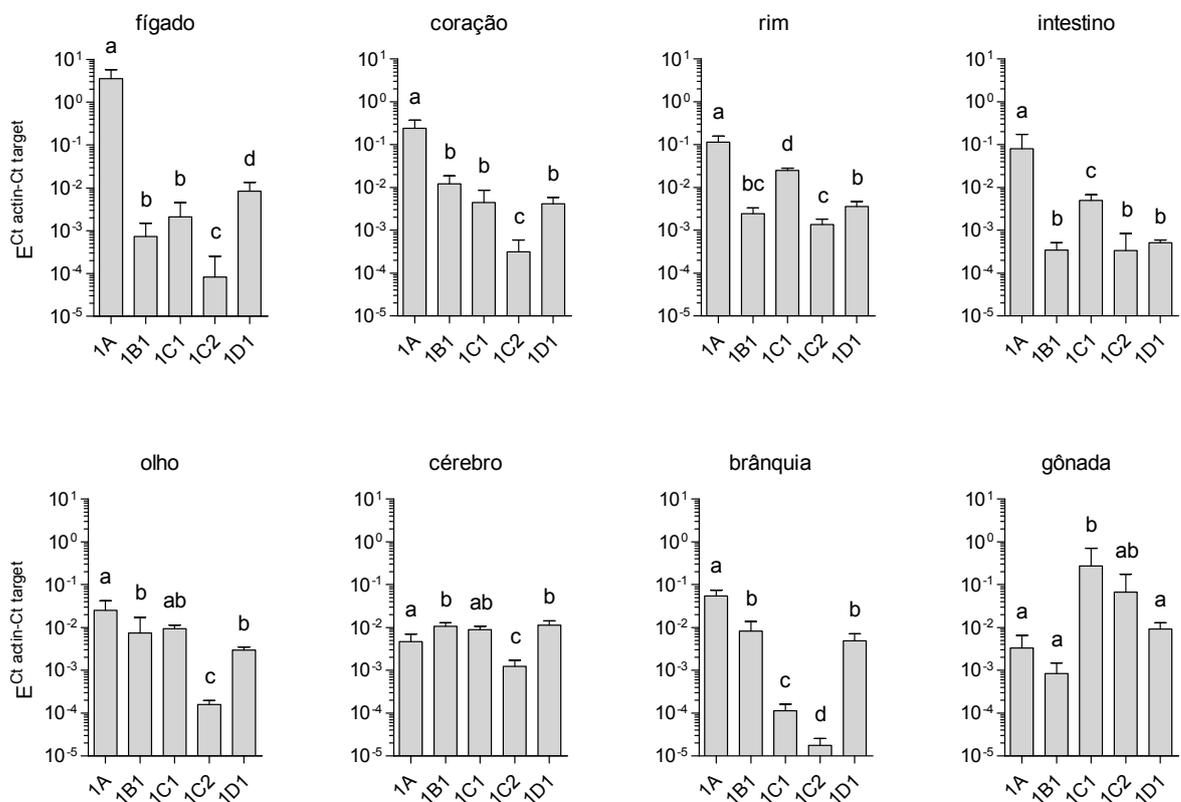


Figura 29. Comparação entre a expressão dos diferentes *CYP1s* em cada órgão estudado. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey HSD, $n=4-10$, $p<0,05$, média \pm desvio padrão). Gráfico representado na forma logarítmica.

A Figura 30 mostra os níveis relativos de transcritos para os cinco *CYP1s*, medidos por PCR em tempo real, comparando os níveis de um dado gene em oito órgãos: fígado, rim, intestino, coração, brânquia, olho, cérebro e gônada. A análise mostrou que os níveis mais altos de transcritos de *CYP1A* foram observados no fígado. Níveis de transcritos de *CYP1B1* também foram elevados no cérebro, coração, brânquia, olho e rim. Estudos anteriores observaram diferenças nos níveis basais de dois genes normalizadores, *ACT* e *ARNT2*, entre diferentes órgãos (JONSSON et al., 2007 b). Devido a isso, com o objetivo de evitar comparações equivocadas nos níveis de *CYP1s* específicos para diferentes órgãos baseados em um dado gene normalizador, a abundância de transcritos foi calculada com base em curvas padrões. Uma normalização individual usando o gene normalizador *ACT* foi órgão-específica para permitir comparações dos níveis de transcritos entre os órgãos. Os níveis mais altos de expressão de *CYP1C1* e *CYP1C2* foram observados no rim, e de *CYP1D1* no cérebro e rim. Os níveis mais baixos de *CYP1A* foram observados na gônada, cérebro e olho, de *CYP1B1* na gônada, intestino e fígado, de *CYP1C1* e *CYP1C2* no fígado e brânquia, de *CYP1D1* no fígado e intestino. De forma geral, *CYP1C1* e *CYP1C2* apresentaram padrões de expressão basal semelhante entre os órgãos.

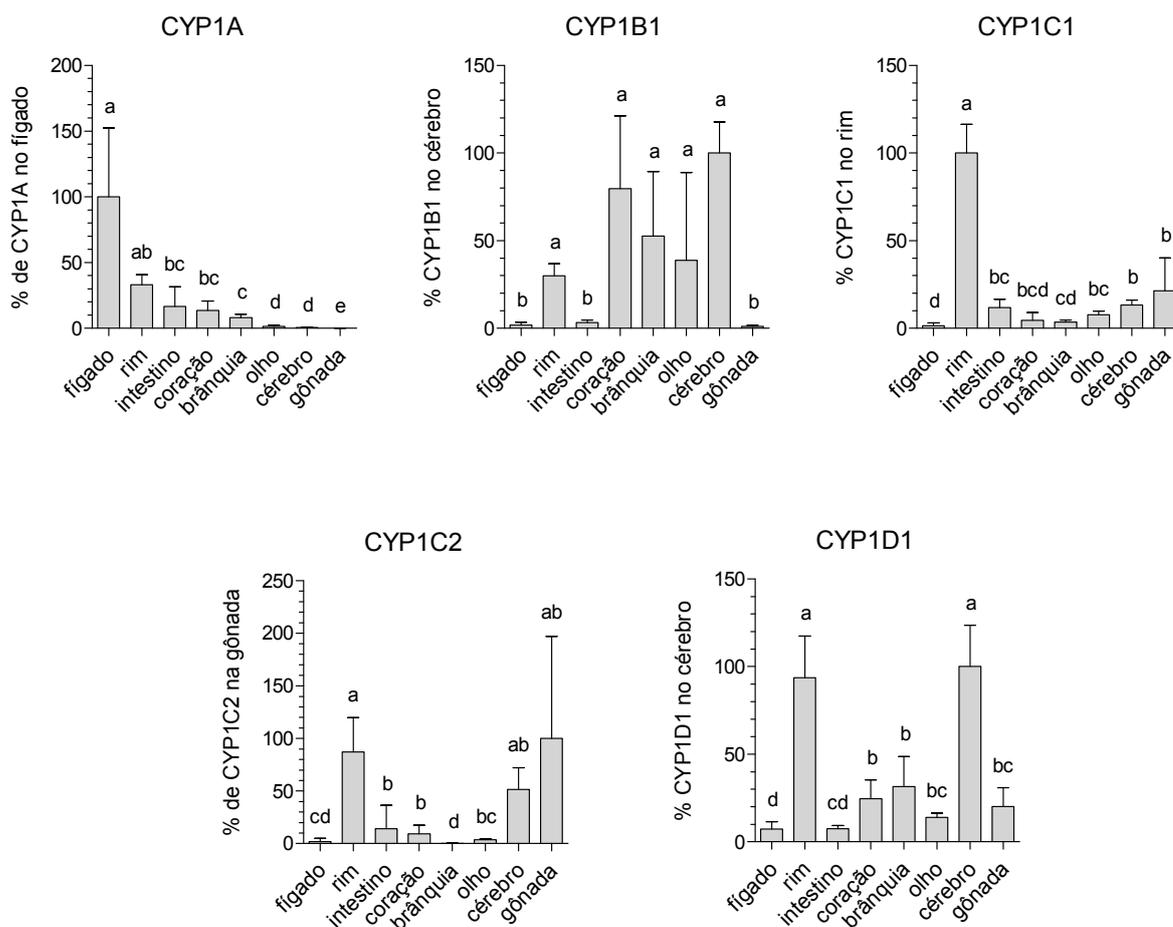


Figura 30. Comparação entre os órgãos estudado para a expressão de cada *CYP1*. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os grupos (ANOVA, Tukey HSD, $n=4-10$, $p<0,05$, média \pm desvio padrão). A expressão gênica relativa está apresentada como percentagem em relação ao órgão de expressão mais elevada.

8.4.4. Efeitos do PCB126 na expressão de *CYP1s* em diferentes órgãos de *F. heteroclitus*

Amostras de órgãos de killifish do grupo controle (DMSO) e tratado (PCB126), provenientes de SC (local referência), foram avaliadas para caracterização dos níveis de indução dos cinco *CYP1s* em diferentes órgãos para PCB126, por PCR em tempo real.

Nenhuma mortalidade dos peixes injetados com PCB126 ou com o carreador DMSO foi observada. PCB126 induziu a expressão de *CYP1A* e *CYP1B1* nos oito órgãos examinados (fígado, coração, rim, intestino, olho, cérebro, brânquia e gônada) (Figura 31). As alterações mais significativas na expressão dos *CYP1s* em resposta ao PCB126 foram no fígado, onde *CYP1C1* foi induzido ~500-vezes e *CYP1B1* ~200-vezes, e na gônada, onde *CYP1A* foi induzido ~700-vezes.

CYP1B1 no fígado e intestino, *CYP1A* no cérebro e *CYP1C1* na brânquia também foram significativamente induzidos (~100-vezes em cada caso).

CYP1C1 também foi induzido em todos os órgãos com excessão da gônada. Apesar de *CYP1C1* e *CYP1C2* possuírem padrões de expressão similares em diferentes órgãos de peixes do grupo controle (Figura 31), *CYP1C2* foi muito menos responsivo a PCB126 se comparado com *CYP1C1*. Por outro lado, *CYP1D1* não foi induzido por PCB126 na dose utilizada em nenhum dos órgãos estudados.

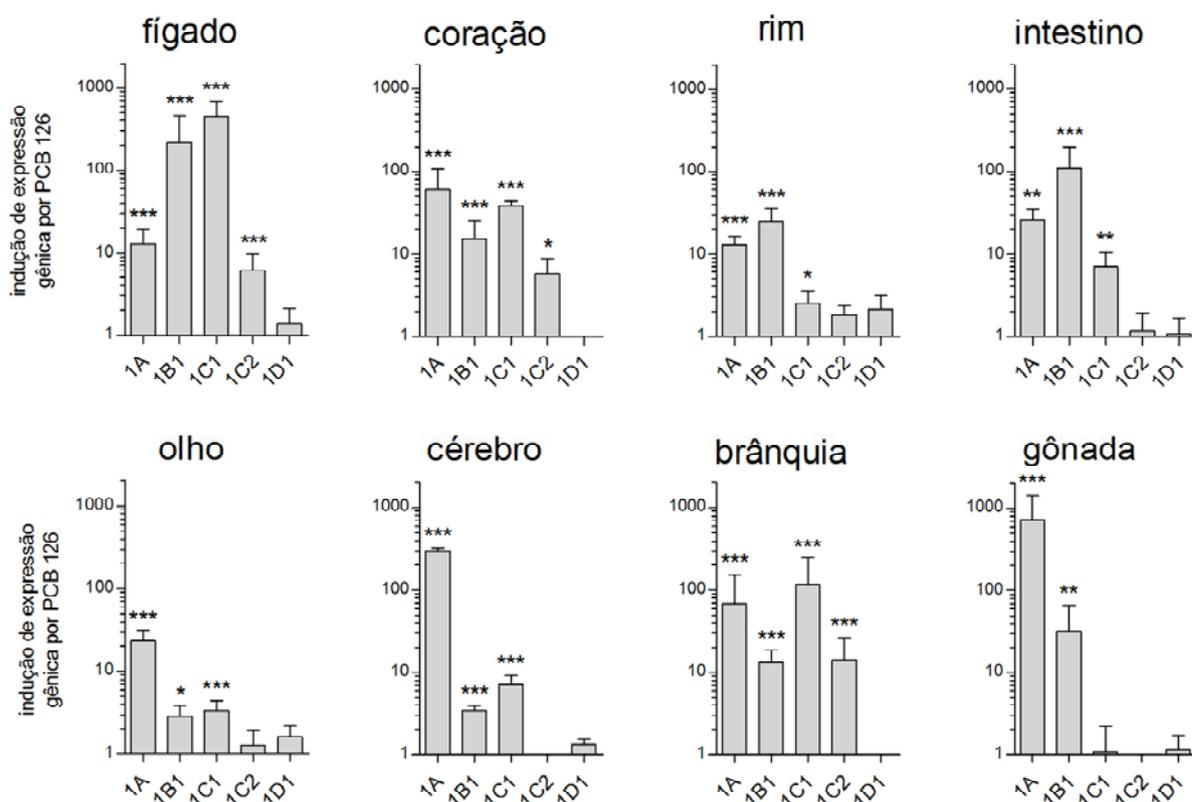


Figura 31. Indução (“vezes de indução”) na expressão dos genes *CYP1* em *F. heteroclitus* injetados com 10 η g PCB126/g de peixe em relação a peixes injetados com o solvente DMSO (controle). Os números representam quantas vezes o gene foi induzido (*fold induction*) no grupo tratado, em relação ao grupo controle. *, ** e *** indicam diferença estatística entre os grupos de $p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0005$, respectivamente (ANOVA, Tukey HSD, $n = 4-10$, média \pm desvio padrão).

8.4.5. Expressão basal de *CYP1s* e indução em laboratório por PCB126 em duas populações de *F. heteroclitus*

As concentrações de PCBs coplanares não-orto substituídos PCB 77, PCB 81 e PCB 126 em carcaças de *F. heteroclitus*, foram muito mais altas em peixes provenientes do *Superfund Site*, New Bedford Harbor (NBH), se comparado aos níveis encontrados em peixes provenientes de Scorton

Creek (SC) (~ 440, 200 e 280 vezes, respectivamente) (Tabela 23). O congênero coplanar não-orto substituído PCB169 foi detectado somente em peixes de NBH ($1,6 \pm 0,6$ ng / g de peixe) e estava abaixo dos níveis de detecção do método em SC (Tabela 23). A soma de outros 18 congêneros de PCB, foi ~700 vezes maior em peixes coletados em NBH do que em peixes coletados em SC ($117.194,3 \pm 32.655,6$ e $170,0 \pm 95,5$ ng PCB / g de peixe, respectivamente) (Tabela 23).

Tabela 23. Concentrações de quatro PCBs não-orto substituídos, e somatório de outros 18 congêneros de PCBs, em carcaça de peixe *F. heteroclitus* coletados em um local referência (Scorton Creek, MA, EUA) e um local historicamente contaminado por PCBs (New Bedford Harbor, MA, EUA).

PCB	Scorton Creek	New Bedford
PCB 81	0.4 ± 0.5 ng/g	82 ± 49 ng/g
PCB 77	3.1 ± 3.1	1358 ± 748
PCB 126	0.4 ± 0.3	110 ± 54
PCB 169	ND	1.6 ± 0.6
Soma de 18 PCBs	170 ± 95	117194 ± 32655

Os níveis de transcritos de *CYP1A* e *CYP1C1* foram mais elevados no fígado dos peixes coletados no local historicamente contaminado por PCBs, NBH, se comparados aos níveis obtidos em SC, local referência (4 e 9 vezes, respectivamente; $P < 0,05$) (Figura 32). Comparando-se os animais oriundos dos dois locais de coleta nenhuma alteração nos níveis basais da expressão de *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* foi observada no fígado de killifish ($P > 0,05$) (Figura 32).

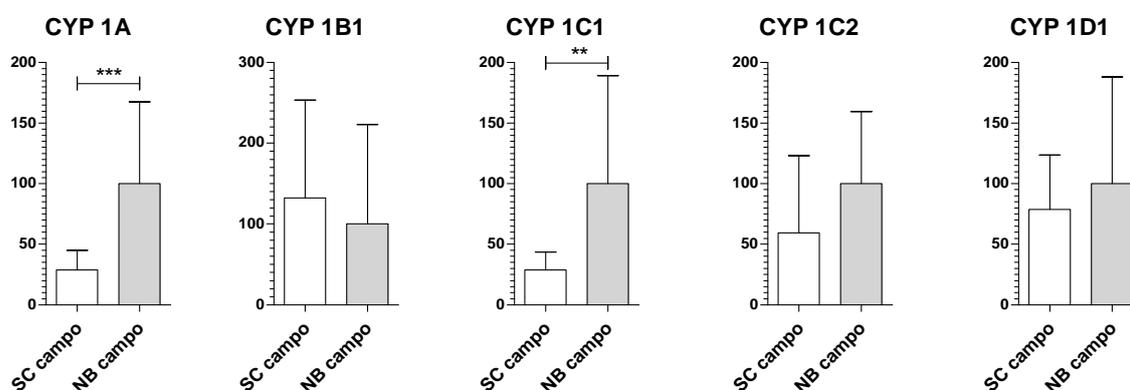


Figura 32. Expressão dos genes *CYPs* nos peixes coletados em dois locais com diferente históricos de contaminação por PCB126, Scorton Creek (SC) e New Bedford Harbor (NB). *indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, T-student, $n = 12$, média \pm desvio padrão).

8.4.6. Indução de *CYP1s* por PCB126 em duas populações de *F. heteroclitus* provenientes de locais com diferentes históricos de contaminação

Peixes *F. heteroclitus* provenientes de SC e NBH foram injetados com PCB126 (10 ng/g de peixe) em laboratório. PCB126 causou respostas bastante distintas na indução de expressão hepática dos *CYP1s* nas duas populações provenientes de locais com diferentes históricos de contaminação (Figura 33). Killifish de SC injetados com PCB126 mostraram uma indução significativa na expressão de quatro *CYP1s* no fígado, em relação a peixes injetados com DMSO. Porém, a população de *F. heteroclitus* proveniente de NBH, apresentou ausência de indução para os mesmos *CYP1s* quando injetados com PCB126 (10 ng/g de peixe). *CYP1D1* não foi induzido por PCB126 em fígado, na população de killifish proveniente de SC ou NBH (Figura 33).

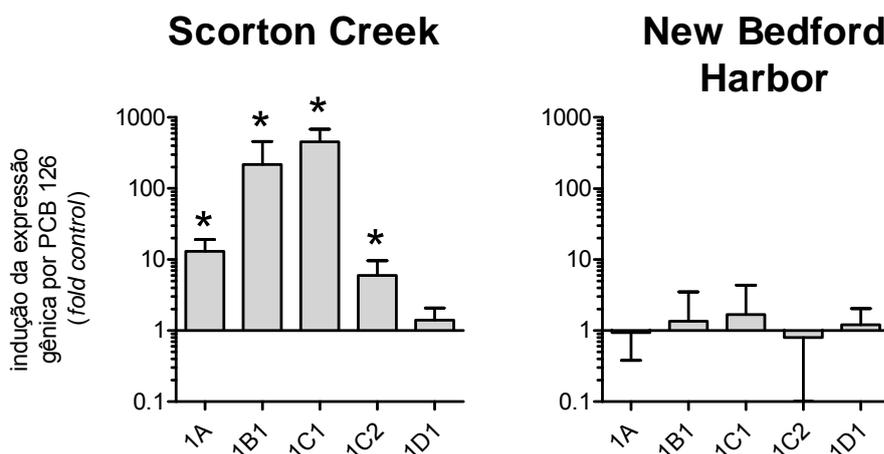


Figura 33. Indução na expressão gênica (vezes de indução) em peixes injetados com PCB126 (10 ng/g peixe) em relação ao grupo controle (injetados com DMSO). *** indica diferença estatística entre os grupos expostos a PCB126 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, teste T, $n = 10$, média \pm desvio padrão).

8.4.7. Clonagem de genes *CYP1* responsivos a contaminantes agonistas do AHR em *P. vivipara*

Foram identificados fragmentos de 653, 587, 1047 e 482 pb para os genes *CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1* e *ACT*, respectivamente, no peixe *P. vivipara*. O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos e sua identidade com sequências de *CYP1* já caracterizadas em outras espécies de peixe confirmou a anotação das sequências como *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1* (Tabela 24). Uma maior identidade das sequências *CYP1s* de *P. vivipara* foi observada em relação aos respectivos genes homólogos na espécie *F. heteroclitus* (84-96 %) do que em relação à espécie *D. rerio* (71-81 %).

Tabela 24– Porcentagem de identidade entre sequências de aminoácido dos CYP1A, CYP1B1 e CYP1C1 do peixe *P. vivipara* (Pv) com CYP1s dos peixes *Fundulus heteroclitus* (A) e *Danio rerio* (B).

A					
	Fh_1A	Fh_1B1	Fh_1C1	Fh_1C2	Fh_1D1
Pv_1A	89	40	43	40	50
Pv_1B1	43	84	51	53	45
Pv_1C1	37	52	93	70	35

B					
	Dr_1A	Dr_1B1	Dr_1C1	Dr_1C2	Dr_1D1
Pv_1A	75	41	40	39	52
Pv_1B1	45	71	55	55	42
Pv_1C1	38	52	81	73	36

8.5. DISCUSSÃO

8.5.1. Identificação de novos genes *CYP1* em *F. heteroclitus*

Com a clonagem e sequenciamento de três novos genes *CYP1*, a família *CYP1* em *F. heteroclitus* foi expandida para quatro famílias e cinco genes, *CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*. Estudos anteriores mostraram que as mesmas famílias e subfamílias existem e são transcritas em peixe-zebra (JONSSON et al., 2007 a; JONSSON et al., 2007 b; GOLDSTONE et al., 2009). Os cinco genes em killifish aparentemente são ortólogos dos mesmos em peixe-zebra, e da mesma forma são expressos em vários órgãos.

Análises de filogenia molecular mostram que *CYP1A* e *CYP1D1* estão agrupados em um mesmo clado, enquanto *CYP1B1* e *CYP1Cs*, estão agrupados em outro. Este resultado é consistente com observações prévias de que *CYP1Cs* e *CYP1Bs* são subfamílias irmãs que se encontram em um clado monofilético (GOLDSTONE et al., 2007; JONSSON et al., 2007 b) e que *CYP1As* e *CYP1Ds* estão em outro (GOLDSTONE et al., 2009). A filogenia molecular comum para genes *CYP1* em várias espécies suportam a hipótese de que *CYP1As* e *CYP1Ds* divergiram de um ancestral *CYP1A/CYP1D* comum, e *CYP1Bs* e *CYP1Cs* de um ancestral *CYP1B/CYP1C* comum (GOLDSTONE et al., 2007; GOLDSTONE et al., 2009).

CYP1C1 e *CYP1C2* são bastante próximos filogeneticamente. Uma relação próxima similar ocorre entre genes *CYP1C1* e *CYP1C2* em baiacú (GODARD et al., 2005), e em peixe-zebra, onde os dois genes estão localizados adjacientemente no cromossomo 17 (JONSSON et al., 2007 b). Estes dados sugerem que os dois *CYP1C* parálogos resultaram de uma duplicação independente, subsequente a divergência das linhagens *CYP1B* e *CYP1C*. Além disso, os resultados são consistentes com a hipótese de que esta duplicação gênica ocorreu após a separação de peixes da linhagem dos vertebrados, e que isso ocorreu antes da duplicação genômica, que é proposto que tenha ocorrido na linhagem de peixes.

Análises filogenéticas também mostram que as sequências de *CYP1* de killifish são filogeneticamente mais relacionadas às sequências de *CYP1* de medaka e stickleback do que de peixe-zebra. Tais similaridades são esperadas, uma vez que peixe-zebra pertence à superordem *Ostariophysi*

enquanto medaka, stickleback e killifish do Atlântico são da superordem *Acanthopterygii*. Estas duas superordens foram separadas há aproximadamente 290 milhões de anos, enquanto *Belontiiformes* (medaka) e *Cyprinodontiformes* (killifish do Atlântico) foram separados mais recentemente, há cerca de 153 milhões de anos atrás (STEINKE; SALZBURGER; MEYER, 2006).

8.5.2. Expressão órgão-específica de *CYP1s* em *F. heteroclitus*

Quando comparado com outros *CYP1s*, altos níveis de transcritos de *CYP1A* foram observados na maioria dos órgãos analisados com exceção de cérebro e gônada. Resultados similares foram observados nos níveis de *CYP1A* nos órgãos da cavidade abdominal (ex.: fígado, rim e intestino) em peixe-zebra e podem estar associados com a função desses órgãos na absorção de nutrientes e processamento dos produtos de excreção do organismo, ex.: detoxificação de metabólitos endógenos e agonistas de AHR oriundos da alimentação (JONSSON et al., 2007 b). Apesar de *CYP1A* ser o transcrito mais abundante no olho e coração, níveis significativos de *CYP1B1* e *CYP1C1* também foram observados nestes tecidos. Yin et al. (2008) mostraram que o nível basal de *CYP1B1* em embriões de peixe-zebra é regulado de forma independente do AHR2, e que *CYP1B1* não está diretamente envolvido na formação do edema pericárdico gerado pela toxicidade de dioxina. É bem conhecido que *CYP1B1* é importante no desenvolvimento do olho em mamíferos (CHOUDHARY et al., 2006) e que mutações neste gene estão relacionadas com glaucoma em populações humanas (OHTAKE et al., 2003). A importância fisiológica destes níveis basais de *CYP1B1* e *CYP1C1* no olho e no coração de peixes permanece para ser elucidada.

Estudos anteriores mostraram maiores níveis de expressão de *CYP1B1* e *CYP1D1* em cérebro de peixes-zebra adultos em relação a outros *CYP1s* (JONSSON et al., 2007 b; GOLDSTONE et al., 2009). A expressão de *CYP1B1* foi observada no cérebro mesmo antes da eclosão das larvas de peixe-zebra (YIN et al., 2008). Da mesma forma, os níveis basais de expressão de *CYP1B1* em cérebro de rato foram maiores do que *CYP1As*, em quatro regiões distintas do cérebro (DESAULNIERS et al., 2005). Ainda não está claro o significado biológico da maior expressão destas isoformas no cérebro.

Altos níveis para todos *CYP1s* foram observados em rim. A expressão de *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1* foi mais elevada neste órgão, o que pode sugerir uma importante função para estes genes,

possivelmente com detoxificação ou excreção. Altos níveis de expressão gênica para muitas enzimas de biotransformação de fase-I, II e III, assim como receptores envolvidos na regulação destes genes, são observados no rim e participam na eliminação de muitos xenobióticos, drogas e substâncias endógenas (XU; KONG, 2005).

A comparação dos níveis de expressão de um *CYP* em diferentes órgãos mostraram um padrão similar para os dois *CYPICs*, com altos níveis em rim, cérebro e gônada, e baixos níveis em fígado e brânquia. Os níveis relativos de expressão de *CYPIC1* em rim, fígado, gônada e olho observados por Wang, Scheffler e Willett (2006) em diferentes populações de *F. heteroclitus* são similares aos resultados para *CYPIC* obtidos neste estudo. *CYPIC2* foi expressa em níveis muito mais baixos do que *CYPIC1*. Assim, possivelmente os dois *CYPICs* sejam regulados por uma via órgão-específica similar, mas desempenhar funções diferentes em um dado órgão.

A observação de que estes cinco *CYP1s* são expressos em killifish de forma semelhante ao peixe zebra é importante, especialmente no caso de *CYP1D1*. Isto porque *CYP1D1* é um pseudo-gene (*CYP1D1P*) (GOLDSTONE et al., 2009) e parece ser um pseudogene em outras espécies (dados não publicados). Assim, identificar o gene *CYP1D1* não significa necessariamente que ele esteja sendo expresso no organismo. O locus *CYP1D1* pode ter sido perdido do genoma de outros animais, incluindo alguns peixes. *CYP1D1* não foi identificado no genoma de baiacú. Em algumas espécies a função de *CYP1D1* pode ser desempenhada por outros *CYPs*, possivelmente *CYP1s*. Seria muito interessante determinar se *CYP1D1* possui especificidade para algum tipo de substrato.

De uma forma geral, similaridades catalíticas são observadas para *CYP1As* de peixes. A especificidade de substratos de outros *CYP1s* em killifish ainda não é conhecida, e são muito pouco conhecidas em peixe-zebra. Os cinco *CYP1s* têm sido expressos em levedura, e foi determinado que *CYP1Cs* e *CYP1D1* atuam em alguns dos mesmos substratos que são oxidados por *CYP1A* (GOLDSTONE et al., 2009 e dados não publicados). Na enguia *Anguilla japonica*, *CYP1C1* aparentemente metaboliza os substratos de *CYP1A* 7-etoxiresorufina e 7-etoxicumarina, embora com atividade catalítica mais baixa. Interessantemente, existem diferenças nos produtos formados a partir de um substrato, uma vez que *CYP1C1* produz dois produtos metabólitos a partir do substrato flavona, enquanto *CYP1A* produz apenas um (UNO et al., 2008).

Estudos com expressão heteróloga de enzimas poderão auxiliar na identificação dos substratos específicos para os diferentes CYP1s. Além disso, para a elucidação da função de um CYP em particular, em um dado órgão será necessária a determinação dos níveis de proteína expressa, e turnover de substrato através do uso de inibidores específicos, ou anticorpos inibidores. Anticorpos foram desenhados para determinação de CYP1D1 e demonstraram que a proteína é expressa em peixe-zebra (GOLDSTONE et al., 2009), porém infelizmente, os mesmos anticorpos não reconhecem CYP1D1 em fígado de *Fundulus heteroclitus* (dados não publicados).

8.5.3. Resposta órgão-específica dos CYP1s para PCB126 em *F. heteroclitus*

Os cinco *CYP1s* de killifish apresentaram respostas distintas para o tratamento com o potente agonista do receptor AHR PCB126. A observação de que *CYP1A* é induzida em todos os órgãos era esperada. Estudos anteriores têm mostrado que *CYP1A* é induzida em altos níveis de expressão em órgãos de detoxificação em peixes (ex.: fígado, trato gastrointestinal, brânquias e rim), e que *CYP1A* é induzida em alguns tipos celulares, como endotélio, em todos os órgãos (ex.: SMOLOWITZ; SCHULTZ; STEGEMAN, 1992). Estudos imunohistoquímicos também têm demonstrado que os níveis da proteína CYP1A é fortemente induzido em todos os órgãos de *Fundulus* expostos a agonistas do receptor AHR (VANVELD et., 1997). O presente estudo também demonstrou que *CYP1B1* foi induzido em todos os órgãos examinados. A mudança mais significativa na expressão de *CYP1* em resposta ao PCB126 foi a indução de *CYP1A* (~700-vezes) em gônada e indução de *CYP1C1* (~500-vezes) em fígado. Da mesma forma, altos níveis de expressão (>100-vezes) foram observados de *CYP1B1* no fígado e intestino, *CYP1A* no cérebro e *CYP1C1* na brânquia.

Em contraste a *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1*, transcritos de *CYP1C2* foram fracamente induzidos e somente em três órgãos analisados (fígado, coração e brânquia), e *CYP1D1* não foi induzido em nenhum dos órgãos analisados. A resposta mais baixa de *CYP1C2* para o potente agonista do receptor AHR foi similar ao encontrado em peixe-zebra. Em peixe-zebra, foi demonstrado que a responsividade de *CYP1C2* para PCB126 diminuiu ao decorrer do desenvolvimento embrionário e é praticamente ausente em peixes adultos (JONSSON et al., 2007 a b). Resultados similares foram observados no presente estudo, mesmo considerando diferentes rotas de entrada do contaminante no

experimento mencionado com peixes-zebra adultos. Nenhuma indução de *CYP1D1* em embriões de peixe-zebra ou adultos tratados com PCB126 ou TCDD foi observada (GOLDSTONE et al., 2009).

O mecanismo envolvido na ausência de resposta de *CYP1C2* para agonistas de AHR em peixes adultos não está elucidado. Porém a ausência na indução de *CYP1D1* pode estar associada com o falta de elementos responsivos funcionais (AREs), que são os sítios de ligação para o complexo AHR/ARNT nas regiões promotoras deste gene (GOLDSTONE et al., 2009). Em peixe-zebra, existem apenas dois AREs putativos (de função não comprovada) no promotor do gene *CYP1D1*, em contraste com os 22 AREs putativos e três comprovadamente funcionais para *CYP1A* (ZERUTH; POLLENZ, 2007; GOLDSTONE et al., 2009). Uma variedade de outros elementos responsivos foram identificados na região promotora de *CYP1D1* de peixe-zebra (GOLDSTONE et al., 2009) e a possibilidade de indução através de outros receptores e agonistas ainda permanece a ser elucidada para *CYP1Cs* e *CYP1D1* em killifish e em peixe-zebra.

A indução de enzimas CYP em fígado de peixe foi primeiramente sugerida como indicadora de contaminação aquática nos anos 70 (ex., PAYNE, 1976). Desde então, vários estudos têm demonstrado que CYP1As em fígado de vertebrados, frequentemente medida por ensaios de cinética enzimática e detecção por *Western blot* são fortemente induzidos por alguns contaminantes orgânicos que representam risco para humanos e para a vida selvagem (ex., PAHs, PCBs coplanares, dibenzofuranos e dibenzodioxinas policloradas) (BUCHELI; FENT, 1995). Os resultados do presente estudo, juntamente a outros (WANG; SCHEFFLER; WILLETT, 2006), sugerem que além de *CYP1A*, outros CYP1s, particularmente *CYP1B1* e *CYP1C1*, tem potencial para serem biomarcadores sensíveis de exposição a contaminantes agonistas do receptor AHR em *F. heteroclitus* e provavelmente em outras espécies de peixes. Por outro lado, *CYP1C2* e *CYP1D1*, respondem mais fracamente a presença de potentes agonistas do receptor AHR em duas espécies diferentes, o que sugere que estes genes não seriam bons marcadores para exposição a tal grupo de substâncias. De qualquer forma, *CYP1C2* e *CYP1D1* podem ainda estar envolvidos na toxicidade de outros agonistas do receptor AHR ou mesmo associadas a alguma outra função relacionada a biotransformação de substratos endógenos. Assim, todas as cinco isoformas de CYP1 podem estar envolvidas nos efeitos tóxicos, e possivelmente na

resistência a agonistas do receptor AHR observada em algumas populações de *Fundulus* (ELSKUS et al., 1999).

Em suma, foram identificados e clonados três novos genes *CYP1*, *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*, no peixe killifish do Atlântico *F. heteroclitus*, um modelo vertebrado usado extensivamente em estudos de toxicologia ambiental. Diferenças substanciais nos níveis de expressão para os cinco *CYP1s* foram observadas nos órgãos examinados. O presente estudo também demonstrou que estes *CYP1s* diferem em suas respostas quando animais são tratados com o potente agonista do receptor AHR, PCB126. Diferentes níveis basais e grau de indução por PCB126 em órgãos específicos sugerem que os mecanismos de regulação dos cinco genes *CYP1* podem diferir. Por fim, estes novos membros da família *CYP1* aumentaram o conjunto de potenciais biomarcadores de contaminação aquática em peixe, e podem auxiliar na elucidação de possíveis mecanismos de toxicidade de agonistas do AHR, e os papéis fisiológicos desta importante família de proteínas.

8.5.4. Expressão gênica de CYP1s em duas populações de killifish expostas a diferentes históricos de contaminação por PCB

O fato de que killifish pode sobreviver a condições agudas de contaminação química por PAHs (WILLS et al., 2009) e PCBs (NASCI et al., 2009) em certas regiões costeiras, levou a escolha desta espécie como um modelo para estudos ambientais e de adaptação a contaminação (BURNETT et al., 2007). No presente estudo, as análises químicas realizadas em duas populações de killifish, uma proveniente de Scorton Creek, MA, EUA (SC), e outra proveniente do *Superfund Site* New Bedford Harbor, MA, EUA (NBH) confirmaram os altíssimos níveis de PCBs nos peixes de NBH. Dentre os congêneros de PCB encontrados, estão os não-orto substituídos (e.g. PCB77, PCB81, PCB126 e PCB169), que são considerados os mais tóxicos, uma vez que são potentes agonistas do receptor AHR, e aumentam o risco de carcinogênese e teratogênese em peixes. As atividades industriais de produção de PCBs em NBH foram interrompidas há décadas e vários esforços de descontaminação deste local foram realizados desde então (BERGEN et al., 2005). Porém, é evidente, pelas análises realizadas neste e em outros estudos (BERGEN et al., 2005), que a bioconcentração e persistência de PCBs neste

local existe até os dias atuais. Portanto, os peixes que habitam NBH, possuem adaptações fisiológicas para evitar os efeitos tóxicos destes compostos observados em altas concentrações em seus tecidos.

Killifish de NBH demonstraram níveis basais aproximadamente quatro vezes maiores na expressão de genes *CYP1A* e *CYP1C1* em fígado em relação a peixes provenientes de um local não contaminado (Scorton Creek). Interessantemente, *CYP1B1*, que assim como *CYP1A* e *CYP1C1*, tem sua expressão regulada pelo receptor AHR, apresentou um padrão distinto para a expressão basal nestas populações. Os maiores níveis na expressão dos genes *CYP1A* e *CYP1C1*, e não dos outros *CYP1s* (*CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*) na população de NBH, podem ter alguma importância para a adaptação deste peixe ao ambiente contaminado por PCB. O envolvimento do receptor AHR na manutenção dos níveis mais altos observados para esta população não é claro, uma vez que não houve indução por PCB126 em laboratório para nenhum dos genes *CYP1s* para esta população de killifish (ver abaixo). É possível que outros mecanismos de regulação estejam envolvidos na manutenção dos níveis basais destes genes. Interações complexas (*cross-talking*) entre AHR e outros receptores (MURPHY; QUADRO; WHITE, 2007; ARUKWE; NORDBO, 2008), possivelmente estejam relacionadas com as respostas distintas observadas para os níveis basais dos diferentes *CYP1s*. A melhor caracterização do papel catalítico das proteínas CYP1 na toxicidade de PCBs é requerida para a compreensão de possíveis mecanismos adaptativos relacionados às diferenças nos níveis basais de expressão gênica observados na população de NBH.

Os quatro *CYP1s* hepáticos de *F. heteroclitus* induzidos pela exposição em laboratório para PCB126 (*CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1* e *CYP1C2*) na população de SC não são induzidos na população de NBH. Algumas populações de killifish de locais altamente poluídos na América do Norte são insensíveis a indução de *CYP1A*, o que tem sido descrito como uma resposta refratária e possivelmente parte do mecanismo de defesa para toxicidade de alguns contaminantes (ELSKUS et al., 1999; BELLO et al., 2001; MEYER et al., 2003). Resultados semelhantes em relação à ausência de indução da proteína *CYP1A* e atividade da EROD na população de NBH, já haviam sido constatados anteriormente (BELLO et al., 2001). A ação das enzimas CYP1 de mamíferos em certos substratos podem gerar metabólitos que contribuem para risco de câncer, defeitos no nascimento, e outros efeitos tóxicos (NEBERT; KARP, 2008). O mecanismo da toxicidade de PCB em peixe não está bem

compreendido, mas existem evidências de que congêneres planares não-orto substituídos podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo desacoplamento do ciclo catalítico de CYP1A (SCHLEZINGER et al., 2006). Assim, a ausência de indução por PCB126 na população de NBH pode representar uma adaptação para evitar a formação de metabólitos tóxicos nestes organismos.

Apesar de vários estudos a respeito de CYP1A terem sido realizados em populações de killifish, nenhum estudo havia avaliado os níveis de indução de outros membros da família 1, principalmente devido ao fato de que *CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*, apenas foram identificados recentemente em *F. heteroclitus* (ZANETTE et al., 2009; presente estudo). O presente estudo acrescentou novas informações a respeito dos níveis de outros *CYP1s* (*CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*) e possível envolvimento dos mesmos em respostas adaptativas de killifish provenientes de um local altamente contaminado por PCB. Tal estudo é importante, principalmente pelo fato de que as respectivas proteínas destes *CYP1s* possivelmente possuam diferentes especificidades para substratos específicos.

Tais estudos, em conjunto, sugerem que a escolha da população de peixe a ser utilizada em programas de monitoramento é fundamental, uma vez que a sensibilidade aos contaminantes pode ser muito variada, quando analisada a indução de *CYP1s* em killifish, e possivelmente em outras espécies de peixe. Além disso, a ausência de indução de *CYP1s* em certas populações de peixes expostas a contaminantes em laboratório, podem indicar exposição crônica para a contaminação nestes locais, o que também representa uma informação valiosa para o monitoramento da contaminação ambiental.

8.5.5. Identificação de *CYP1s* em *P. vivipara*

Foram identificados três genes *CYP1s* na espécie de peixe *P. vivipara*. Estes genes foram anotados preliminarmente como *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1*, e são conhecidamente induzidos por agonistas do receptor AHR em outros peixes, como por exemplo, o peixe-zebra e o killifish (JONSSON et al., 2007 a b; ZANETTE et al., 2009).

A alta identidade destas sequências com a espécie de peixe *F. heteroclitus* (84-96 %), mesmo se tratando de um grupo de genes pouco conservados como é o caso da superfamília CYP, sugere que

o conhecimento já acumulado na literatura para o killifish possa ter aplicabilidade para orientar estudos futuros a serem desenvolvidos utilizando *P. vivipara*. Portanto, tal similaridade com *F. heteroclitus*, pode ser apontada como mais uma vantagem no uso desta espécie como espécie modelo em estudos ambientais em regiões costeiras, assim como tem sido sugerido em outros estudos (ex.: GOMES; MONTEIRO, 2008).

A expressão dos genes *CYP1* responsivos a contaminantes identificados em *P. vivipara*, poderá também ser validada em estudos de campo a fim de avaliar o seu potencial para utilização como biomarcadores de contaminação aquática utilizando esta espécie de peixe no monitoramento de regiões costeiras no Brasil.

8.6. CONCLUSÕES

- Três novos genes de citocromo P450 da família 1 (*CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*) foram identificados no peixe-modelo para estudos ambientais *F. heteroclitus*. Similarmente aos outros dois *CYP1s* previamente conhecidos (*CYP1A* e *CYP1C1*), *CYP1B1* é altamente responsivo a substâncias agonistas do receptor AHR, servindo como um potencial biomarcador para estas substâncias. Porém os outros dois novos genes *CYP1s* são fracamente (no caso de *CYP1C2*) ou nada (no caso de *CYP1D1*) induzíveis para estas substâncias, e possivelmente atuam em funções endógenas no organismo.
- Os genes *CYP1* de peixe (*CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*), mostraram distintos padrões de expressão quanto à sua distribuição órgão-específica e indução por PCB 126, o que permitiu a escolha de combinações órgão/*CYP1* mais apropriadas para detecção de contaminantes agonistas do receptor AHR a ser utilizado em futuros estudos ecotoxicológicos. As maiores induções foram observadas para as combinações gônada/*CYP1A* (aproximadamente 700 vezes), fígado/*CYP1C1* (aproximadamente 500 vezes), fígado e intestino/*CYP1B1*, cérebro/*CYP1A* e brânquia/*CYP1C1* (>100 vezes).
- Estudos em uma população de *F. heteroclitus* proveniente de um local historicamente contaminado por PCB (New Bedford Harbor, MA, EUA) mostraram diferenças marcantes na expressão dos genes *CYP1s* revelando um possível envolvimento destes CYPs em mecanismos de adaptação para sobrevivência nestes locais altamente contaminados. Estes resultados também sugerem que a escolha da população de *F. heteroclitus* para estudos ecotoxicológicos tem um caráter crucial na utilização dos *CYP1s* como biomarcadores de exposição a contaminantes agonistas do receptor AHR nesta espécie.
- Os genes biomarcadores *CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1* mais apropriados para detecção de contaminantes agonistas do AHR dentre os *CYP1s*, também foram clonados no peixe *P.*

vivipara, e poderão servir como biomarcadores de contaminação aquática nesta espécie amplamente distribuída em ambientes contaminados da costa Brasileira.

9. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos genes de interesse para estudos ecotoxicológicos foram identificados em organismos marinhos e estuarinos. Dentre estes organismos, estão moluscos bivalves como o mexilhão *Mytilus edulis*, distribuído em regiões com clima temperado, e a ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae*, tipicamente encontrada na costa brasileira. Novos genes também foram identificados em um peixe modelo da América do Norte, o killifish (*Fundulus heteroclitus*) e uma potencial espécie modelo para estudos ambientais em estuários e marismas da costa Brasileira, o barrigudinho (*Poecilia vivipara*). A validação e utilização da técnica de PCR em tempo real para avaliação quantitativa da expressão destes genes também foi realizada. Utilizando esta metodologia, estudos futuros poderão avaliar com maior precisão possíveis substâncias químicas ou condições ambientais (bióticas/abióticas) que estejam envolvidas na regulação da expressão destes genes, e que potencialmente terão aplicabilidade no monitoramento ambiental, tanto para a detecção da presença de misturas ou substâncias químicas no ambiente aquático, como para avaliação de efeitos tóxicos causados por tais contaminantes.

Alguns dos novos genes identificados na ostra *C. rhizophorae* (ver Capítulo I) poderão ter sua utilização como biomarcadores de esgoto doméstico validada em estudos posteriores. Dentre eles, estão os genes *CAT*, *MDR*, *SDR*, cavortina, *CYP4-like*, *TMSB4* e *SLC25A38*. Uma vez que as propriedades bioquímicas e importância fisiológica das proteínas traduzidas por esses genes, ainda permanecem por elucidação em moluscos, estudos futuros poderão revelar aplicações biotecnológicas adicionais, além da importância para o monitoramento costeiro. O papel das novas proteínas traduzidas por estes genes no metabolismo, imunidade para patógenos, detoxificação de substâncias químicas (naturais ou antropogênicas) poderão apresentar aplicações para os campos relacionados à aquicultura, ecologia marinha, avaliação dos recursos pesqueiros, farmacologia, dentre outras.

O desenho experimental utilizado no Capítulo I para o estudo de campo, incluiu a análise de parâmetros hidroquímicos, químicos e microbiológicos, juntamente com os biomarcadores. Os resultados mostram que a região de São José (desembocadura do Rio Bucheler), representa um local potencial para estudos que avaliem os efeitos causados pelo despejo de esgoto doméstico *in natura* em uma região costeira. Futuramente, outros enfoques, como por exemplo, a investigação de diferenças

genéticas em populações de *C. rhizophorae* destes locais, poderão demonstrar adaptações destes organismos que permitem a sua sobrevivência em tais condições críticas. Neste sentido uma análise de polimorfismos em determinadas sequências gênicas poderão mostrar diferenças importantes ao nível populacional causados pela contaminação costeira.

Buscas realizadas em bibliotecas de ESTs de moluscos bivalves possibilitaram, pela primeira vez na literatura, a verificação da existência de uma ampla diversidade de genes expressos da superfamília citocromo P450 (CYP) neste grupo de organismos (cerca de 60 sequências únicas). Nas últimas décadas, dezenas de estudos de ecotoxicologia foram realizados utilizando-se metodologias de detecção de CYPs originalmente desenhadas para outros organismos, como *Western Blot* com anticorpos de peixes e camundongos, e ensaios de atividade enzimática com substratos para CYPs de vertebrados. Tais estudos tem sido criticados recentemente na literatura especializada, pela inespecificidade destas metodologias para detecção/quantificação de isoformas de CYPs em moluscos bivalves. A caracterização detalhada de alguns dos genes CYP em moluscos bivalves, pela presente tese, permitiu a utilização da técnica de PCR em tempo real para avaliação de expressão gênica ao nível quantitativo, solucionando um problema histórico em estudos toxicológicos relacionado a quantificação de citocromos P450 em moluscos bivalves.

A exemplo do que é observado para a superfamília CYP em insetos, grupo não-vertebrado melhor estudado até então, é provável que os CYPs de moluscos bivalves apresentem diferenças marcantes em comparação aos CYPs de vertebrados, tanto em relação a indução por contaminantes e outras substâncias, como em relação a especificidade para diferentes substratos. O presente estudo, demonstrou por exemplo, que substância indutoras de *CYP1* em vertebrados, não foram indutoras de *CYP1-like* em mexilhão, porém, induziram genes *CYP3-like* e *CYP26-like*. Estudos futuros que avaliem a expressão conjunta de todos os genes CYP de molusco bivalve, utilizando técnicas como *microarray*, poderão identificar novos genes CYP induzidos ao nível de expressão gênica para substâncias químicas específicas. Em complementação a isso, estudos de expressão recombinante destes CYPs para caracterização da atividade da proteína e estudos de *knockdown* / *knockout* poderão demonstrar importância toxicológicas e fisiológicas ainda desconhecidas, para estas proteínas em moluscos, assim como já foi constatado anteriormente em algumas espécies de insetos.

Em peixe *Fundulus heteroclitus*, foram identificados novos genes citocromo P450 da família 1 (*CYP1B1*, *CYP1C2* e *CYP1D1*), além dos *CYP1A* e *CYP1C1* já conhecidos, e sua indução por um contaminante agonista do receptor AHR (PCB126) foi avaliada para diferentes condições experimentais. A escolha das isoformas de *CYP1*, do órgão analisado, e da população de peixe utilizada, se mostrou crucial para utilização destes genes como ferramenta no monitoramento ambiental. As combinações órgão/*CYP1* mais apropriadas para detecção desta classe de contaminantes por PCR em tempo real em *F. heteroclitus*, foram gônada masculina/*CYP1A* (> 700 vezes de indução), fígado/*CYP1C1* (> 500 vezes de indução), fígado e intestino/*CYP1B1*, cérebro/*CYP1A* e brânquia/*CYP1C1* (>100 vezes de indução). A indução dos genes identificados pela primeira vez em *Poecilia vivipara* (*CYP1A*, *CYP1B1* e *CYP1C1*) poderão ser validadas em estudos de campo ou laboratório, e utilizados como importantes ferramentas no monitoramento ambiental de regiões contaminadas da costa brasileira.

Uma população proveniente de um local historicamente contaminado por PCBs (New Bedford Harbor, Massachusetts, EUA) apresentou uma resposta refratária (ausência de indução de *CYP1*), demonstrando que a indução destes genes pode ser distinta para populações geograficamente afastadas, e possivelmente, tal resposta faz parte do conjunto de adaptações que estes organismos possuem para sobreviver em regiões altamente impactadas por poluentes. Estudos futuros poderão identificar substratos específicos para as proteínas traduzidas pelos novos genes da família 1 identificados, utilizando metodologias complementares, como por exemplo de expressão recombinante dessas proteínas em bactéria ou levedura, e poderão revelar novas funções (para compostos exógenos ou endógenos) nestes organismos.

Em suma, foram identificados novos marcadores moleculares bastante específicos e sensíveis para a presença de substâncias químicas no ambiente aquático, utilizando peixes como organismos monitores. Porém, uma menor especificidade/sensitividade de marcadores foi observada utilizando-se moluscos bivalves. Em conclusão, o presente estudo sugere que a utilização de peixes para o monitoramento ambiental utilizando-se biomarcadores, ainda é preferível, se comparada a utilização de moluscos bivalves. Tal constatação já era de certa forma esperada, uma vez que o conhecimento científico acumulado, ao nível fisiológico, bioquímico e de biologia molecular, para peixes e outros

vertebrados é muito maior do que para moluscos bivalves e invertebrados em geral. Futuramente, estudos como o da presente tese, que venham a contribuir para um melhor conhecimento científico dos moluscos bivalves, poderão revelar novas aplicações para a utilização destes organismos no monitoramento ambiental e estudos ecotoxicológicos, e possivelmente a descoberta de biomarcadores de contaminação aquática tão sensíveis quanto os previamente caracterizados em vertebrados.

10. REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885. 2005.
- ADAMS, S. M. et al. The Use of Bioindicators for Assessing the Effects of Pollutant Stress on Fish. **Marine Environmental Research**, v. 28, n. 1-4, p. 459-464. 1989.
- AEBI, H. Catalase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York, 1974, v., p. 673-677
- ALBALAT, R.; CANESTRO, C. Identification of Aldh1a, Cyp26 and RAR orthologs in protostomes pushes back the retinoic acid genetic machinery in evolutionary time to the bilaterian ancestor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 178, n. 1-3, p. 188-196. 2009.
- ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 588-600. 2007.
- ALVES, S. R. C. et al. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 241-245. 2002.
- APHA-AWWA-WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20^a ed. 1999.
- ARANA, Luis Vinatea. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. 2. ed. Florianópolis: Editora da UFSC. 2004. 231 p.
- ARUKWE, A.; NORDBO, B. Hepatic biotransformation responses in Atlantic salmon exposed to retinoic acids and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB congener 77). **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 4, p. 470-482. 2008.
- BALDWIN, W. S.; MARKO, P. B.; NELSON, D. R. The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. **BMC Genomics**, v. 10, n., p. -. 2009.
- BAO, Y. B. et al. Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 1, p. 17-25. 2009.
- BARAJ, B.; NIENCHESKI, L. F.; CORRADI, C. Trace metal content trend of mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) from the Atlantic Coast of Southern Brazil. **Water Air and Soil Pollution**, v. 145, n. 1, p. 205-214. 2003.
- BAUMARD, P. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. **Marine Environmental Research**, v. 47, n. 1, p. 17-47. 1999.
- BAUMGARTEN, M. G. Z.; NIENCHESKI, L. F. H.; KUROSHIMA, K. N. Qualidade das águas estuarinas que margeiam o município do Rio Grande (RS): nutrientes e detergente dissolvidos. **Atlântica**, v. 17, n., p. 17-34. 1995.

- BEBIANNI, M. J. et al. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 550-558. 2007.
- BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 285-298. 2001.
- BELLO, S. M. et al. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: In vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. **Toxicological Sciences**, v. 60, n. 1, p. 77-91. 2001.
- BENINGER, P. G.; VENIOT, A.; POUSSART, Y. Principles of pseudofeces rejection on the bivalve mantle: integration in particle processing. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 178, n., p. 259-269. 1999.
- BENINGER, P. G. et al. Impact of seston characteristics on qualitative particle selection sites and efficiencies in the pseudolamellibranch bivalve *Crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 360, n. 1, p. 9-14. 2008.
- BENOLIEL, M. J. Pesticidas organoclorados e policlorobifenis em mexilhão na Costa Portuguesa – “Mussel Watch”. In: **Anais do Instituto Hidrográfico**, 1986, Lisboa, v. 7, p. 75-77.
- BERGAYOU, H. et al. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 3, p. 765-769. 2009.
- BERGEN, B. J. et al. Environmental monitoring of remedial dredging at the New Bedford Harbor, MA, Superfund site. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 111, n. 1-3, p. 257-275. 2005.
- BIRNEY, E.; CLAMP, M.; DURBIN, R. GeneWise and genomewise. **Genome Research**, v. 14, n. 5, p. 988-995. 2004.
- BOCCHETTI, R. et al. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 257-266. 2008.
- BOESCH, D. F. et al. **Marine Pollution in the United States - Pew Oceans Commission**. 2001. 55p. Disponível em: <http://www.pewtrusts.org/pdf/env_pew_oceans_pollution.pdf>. Acesso em: agosto de 2005.
- BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: FAPESP-HUCITEC, 1979. 198 p.
- BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229-246. 2009.
- BREDEN, F. et al. Molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes : Poeciliidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 95-104. 1999.
- BRICELJ, V. M. et al. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 763-767. 2005.
- BROWN, D. J.; CLARK, G. C.; VAN BENEDEN, R. J. A new cytochrome P450 (CYP30) family identified in the clam, *Mercenaria mercenaria*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 121, n. 1-3, p. 351-360. 1998.

- BROWN, M. et al. Application of SSH and a macroarray to investigate altered gene expression in *Mytilus edulis* in response to exposure to benzo[a]pyrene. **Marine Environmental Research**, v. 62, n., p. S128-S135. 2006.
- BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of Cytochrome-P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201-268. 1995.
- BULTELLE, F. et al. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 385-389. 2002.
- BURNETT, K. G. et al. Fundulus as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. **Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics**, v. 2, n. 4, p. 257-286. 2007.
- BUTLER, R. A. et al. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. **Gene**, v. 278, n. 1-2, p. 223-234. 2001.
- CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311. 2000.
- CANESI, L. et al. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p. 994-1002. 2007.
- CANESI, L. et al. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 272-279. 2008.
- CANOVA, S. et al. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 1, p. 17-30. 1998.
- CAO, C.; LENG, Y. M.; KUFÉ, D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29667-29675. 2003.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, n., p. 484-490. 1985.
- CARRANZA, A.; DEFFEO, O.; BECK, M. Diversity, conservation status and threats to native oysters (Ostreidae) around the Atlantic and Caribbean coasts of South America. **Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 19, n. 3, p. 344-353. 2009.
- CAVALLARI, M. M. Costa da morte envenenada. **Revista Época**, v. 236, n., p. 78-80. 2002.
- CHATY, S.; RODIUS, F.; VASSEUR, P. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 81-93. 2004.
- CHEUNG, C. C. C. et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3-4, p. 189-203. 2001.

- CHOUDHARY, D. et al. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 414, n. 1, p. 91-100. 2003.
- CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). 2005. Resolução Nº 357, 17 março 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>, acessado em 20 de julho de 2008 às 11:31h.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676. 2005.
- CONNERS, D. E.; RINGWOOD, A. H. Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 4, p. 341-349. 2000.
- CONTARDO-JARA, V.; WIEGAND, C. Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. **Environmental Pollution**, v. 155, n. 1, p. 182-189. 2008.
- DA SILVA, A. Z. et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 376-382. 2005.
- DESAULNIERS, D. et al. Comparisons of brain, uterus, and liver mRNA expression for Cytochrome p450s, DNA methyltransferase-1, and Catechol-O-Methyltransferase in prepubertal female Sprague-Dawley rats exposed to a mixture of aryl hydrocarbon receptor agonists. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 175-184. 2005.
- DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical Responses in Aquatic Animals - a Review of Determinants of Oxidative Stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1103-1123. 1989.
- DONDERO, F. et al. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n., p. S13-S24. 2006.
- DOYEN, P.; VASSEUR, P.; RODIUS, F. Identification, sequencing and expression of selenium-dependent glutathione peroxidase transcript in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to Aroclor 1254. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 122-129. 2006.
- DUNN, C. W. et al. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. **Nature**, v. 452, n. 7188, p. 745-U5. 2008.
- DUTERTRE, M. et al. Functional responses associated with pallial organ variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 352, n. 1, p. 139-151. 2007.
- EKINS, S. et al. Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 8, n., p. -. 2008.
- ELSKUS, A. A. et al. Altered CYP1A expression in *Fundulus heteroclitus* adults and larvae: a sign of pollutant resistance? **Aquatic Toxicology**, v. 45, n. 2-3, p. 99-113. 1999.
- ENDO, S. et al. Molecular determinants for the stereospecific reduction of 3-ketosteroids and reactivity towards all-trans-retinal of a short-chain dehydrogenase/reductase (DHRS4). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 481, n. 2, p. 183-190. 2009.

- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194. 1998.
- FRANCIONI, E. et al. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 329-338. 2007.
- FROUIN, H. et al. Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. **Aquatic Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 120-134. 2007.
- FUJITA, S. et al. P450 in wild animals as a biomarker of environmental impact. **Biomarkers**, v. 6, n. 1, p. 19-25. 2001.
- GALLOWAY, T. S. et al. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project - a multi-biomarker approach to ecosystem management. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2-5, p. 233-237. 2004.
- GISONDI, A.; GRANT, S.; BECK, G. Analysis of pollution by microarray using the blue mussel *Mytilus edulis*. **Journal of Immunology**, v. 176, n., p. S78-S78. 2006.
- GESAMP. Reports and Studies No.47 IMO/FAO/Unesco/WMO/WHO/ IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (GESAMP) Reducing Environmental Impacts of Coastal Aquaculture Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Relatório**. Roma. 1991
- GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further Studies on the Properties and Assay of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase of Rat Liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 400-408. 1953.
- GODARD, C. A. J. et al. The new vertebrate CYP1C family: Cloning of new subfamily members and phylogenetic analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 4, p. 1016-1024. 2005.
- GOLDSTONE, J. V. et al. The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. **Developmental Biology**, v. 300, n. 1, p. 366-384. 2006.
- GOLDSTONE, J. V. et al. Cytochrome p450 1 genes in early deuterostomes (tunicates and sea urchins) and vertebrates (chicken and frog): Origin and diversification of the CYP1 gene family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 12, p. 2619-2631. 2007.
- GOLDSTONE, J. V. Environmental sensing and response genes in cnidaria: the chemical defensome in the sea anemone *Nematostella vectensis*. **Cell Biology and Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 483-502. 2008.
- GOLDSTONE, J. V. et al. Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1-2, p. 7-16. 2009.
- GOMES, J. L.; MONTEIRO, L. R. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): test of an ecomorphological paradigm. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 93, n. 4, p. 799-812. 2008.
- GONZALEZ, M. et al. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 2, p. 1089-1097. 2005.

- GORBI, S. et al. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. **Marine Environmental Research**, v. 65, n. 1, p. 34-49. 2008.
- GOSLING, E. **The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture**. Amsterdam: Elsevier. 1992. 565 p.
- GREEN, T. J. et al. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 5, p. 799-810. 2009.
- GROSVIK, B. E. et al. CYP1A-immunopositive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 334-340. 2006.
- GUENGERICH, F. P. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n., p. 1-17. 1999.
- GUERNSEY, D. L. et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. **Nature Genetics**, v. 41, n. 6, p. 651-653. 2009.
- GUTJAHR-GOBELL, R. E. et al. Feeding the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) a diet spiked with non-ortho- and mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls: Accumulation and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 699-707. 1999.
- HAGGER, J. A. et al. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 6, p. 1111-1118. 2008.
- HAHN, M. E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, n. 1-2, p. 131-160. 2002.
- HAHN, M. E.; HESTERMANN, E. V. Receptor-mediated mechanisms of toxicity. In: DI GIULIO, R. T., HINTON, D. E. . **The Toxicology of Fishes**: CRC Press, 2008, v., p. 235
- HAITINA, T. et al. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. **Genomics**, v. 88, n. 6, p. 779-790. 2006.
- HAN, L.; ZHAO, Z. M. Comparative analysis of CpG islands in four fish genomes. **Comparative and Functional Genomics**, v., n., p. -. 2008.
- HANSEN, B. H. et al. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics**, v. 2, n. 3, p. 250-256. 2007.
- HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J. G. Amino-Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 10915-10919. 1992.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of Lipid-Peroxidation in Tissue-Extracts Based on Fe(II)Xylenol Orange Complex-Formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280. 1995.

HINTON, D. E. et al. Aquatic animal models of human disease: Selected papers and recommendations from the 4th Conference. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 121-128. 2009.

HO, K. T. et al. Identification of acute toxicants in New Bedford Harbor sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 551-558. 1997.

HUANG, X. Q.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877. 1999.

HUGHES, K. A. Influence of seasonal environmental variables on the distribution of presumptive fecal coliforms around an Antarctic research station. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4884-4891. 2003.

HUVET, A. et al. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. **Gene**, v. 343, n. 1, p. 211-220. 2004.

ISLA, L. A. S. **Análises de biomarcadores bioquímicos e concentração de metais em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) cultivados no Litoral central de Santa Catarina**. 2000. 50 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

ISOBE, T. et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in south and southeast Asian mussels. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 135, n. 1-3, p. 423-440. 2007.

JARDE, E.; MANSUY, L.; FAURE, P. Organic markers in the lipidic fraction of sewage sludges. **Water Research**, v. 39, n. 7, p. 1215-1232. 2005.

JAYARAMAN, S.; PRUELL, R. J.; MCKINNEY, R. Extraction of organic contaminants from marine sediments and tissues using microwave energy. **Chemosphere**, v. 44, n. 2, p. 181-191. 2001.

JENNY, M. J. et al. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Marine Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 81-93. 2002.

JENNY, M. J. et al. A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 577-591. 2007.

JERNELOV, A. The international mussel watch: A global assessment of environmental levels of chemical contaminants. **Science of the Total Environment**, v. 188, n., p. S37-S44. 1996.

JO, P. G.; CHOI, Y. K.; CHOI, C. Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 4, p. 460-469. 2008.

JONSSON, M. E. et al. Role of AHR2 in the expression of novel cytochrome p450 1 family genes, cell cycle genes, and morphological defects in developing zebra fish exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 180-193. 2007 a.

JONSSON, M. E. et al. Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 221, n. 1, p. 29-41. 2007 b.

- KAPPUS, H. Overview of Enzyme-Systems Involved in Bio-Reduction of Drugs and in Redox Cycling. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 1-6. 1986.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of Glutathione S-Transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188. 1976.
- KENNISH, M. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. London: CRC Press. 1991. 494 p.
- KEPPLER, C.; RINGWOOD, A. H. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 3-4, p. 195-204. 2001.
- KIM, J. H. et al. Molecular cloning and beta-naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 433-440. 2008.
- KOSKINEN, H. et al. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 3, p. 745-753. 2004.
- KREIL, D. P.; OUZOUNIS, C. A. Comparison of sequence masking algorithms and the detection of biased protein sequence regions. **Bioinformatics**, v. 19, n. 13, p. 1672-1681. 2003.
- KISTNER, W. International Mussel Watch. **Oceans**, v. 17, n. 6, p. 64-67. 1984.
- LAMBERT, G. H. et al. Induced CYP1A2 activity as a phenotypic biomarker in humans highly exposed to certain PCBs/PCDFs. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 19, p. 6176-6180. 2006.
- LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 1, p. 57-72. 1996.
- LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 216-237. 2005.
- LIMA, I. et al. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1230-1242. 2007.
- LIVINGSTONE, D. R. Biochemical differences in field populations of the common mussel *Mytilus edulis* L. exposed to hydrocarbons: Some considerations of biochemical monitoring. In: BOLIS, L.; ZADUNAISKY, J.; GILLES, R. **Toxins, Drugs, and Pollutants in Marine Animals**. Berlin: Springer, 1984, v., p. 161-175
- LIVINGSTONE, D. R.; FARRAR, S. V. Tissue and Subcellular-Distribution of Enzyme-Activities of Mixed-Function Oxygenase and Benzo[a]Pyrene Metabolism in the Common Mussel *Mytilus edulis* L. **Science of the Total Environment**, v. 39, n. 3, p. 209-235. 1984.
- LIVINGSTONE, D. R.; KIRCHIN, M. A.; WISEMAN, A. Cytochrome-P-450 and Oxidative-Metabolism in Mollusks. **Xenobiotica**, v. 19, n. 10, p. 1041-1062. 1989.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and Pollution Monitoring - Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 195-211. 1993.
- M.E.S.L., I.A.E.A. **Standard Operating Procedures**, Monaco, 1997, 85 pp.

- MALINDA, K. M. et al. Thymosin beta 4 accelerates wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 3, p. 364-368. 1999.
- MARIGOMEZ, I.; LEKUBE, X.; CANCIO, I. Immunochemical localisation of proliferating cells in mussel digestive gland tissue. **Histochemical Journal**, v. 31, n. 12, p. 781-788. 1999.
- MARTINS, C. C. et al. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: Origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 1359-1363. 2008.
- MATSON, C. W. et al. Development of the morpholino gene knockdown technique in *Fundulus heteroclitus*: A tool for studying molecular mechanisms in an established environmental model. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 289-295. 2008.
- MCCURLEY, A. T.; CALLARD, G. V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. **Bmc Molecular Biology**, v. 9, n., p. -. 2008.
- MCLEOD, C. et al. Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1220-1230. 2009.
- MEDEIROS, I. D. **Expressão gênica diferencial em ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico**. 2008. 132 f. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- MEISTERTZHEIM, A. L. et al. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. **Febs Journal**, v. 274, n. 24, p. 6392-6402. 2007.
- MEYER, J. N. et al. Expression and inducibility of aryl hydrocarbon receptor pathway genes in wild-caught killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different contaminant-exposure histories. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2337-2343. 2003.
- MINIER, C. et al. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 455-459. 2002.
- MINILLO, A.; FERREIRA, A. H.; YUNES, J. S. Detecção de microcistinas em florações de *Microcystis aeruginosa* no estuário da lagoa dos patos, RS, entre 1997 E 1998. **Atlântica**, v. 22, n., p. 81-93. 2000.
- MIRLEAN, N. et al. The effect of accidental sulphuric acid leaking on metal distributions in estuarine sediment of Patos Lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 11, p. 1114-1117. 2001.
- MMA. **Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União (Ministério do Meio Ambiente)**. Rio de Janeiro, 1996. CD-ROM
- MOHAN, P. K. et al. Metabolic Consequences of Methyl Parathion Exposure in the Bivalve, *Lamellidens marginalis* (Lamarck). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 509-514. 1987.
- MONARI, M. et al. Effect of exposure to benzo[a]pyrene on SODs, CYP1A1/1A2-and CYP2E1 immunopositive proteins in the blood clam *Scapharca inaequivalvis*. **Marine Environmental Research**, v. 63, n. 3, p. 200-218. 2007.

- MONARI, M. et al. Chloramphenicol influence on antioxidant enzymes with preliminary approach on microsomal CYP1A immunopositive-protein in *Chamelea gallina*. **Chemosphere**, v. 73, n. 3, p. 272-280. 2008.
- MORAES, T. B. et al. Antioxidant properties of the mucus secreted by *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): A defense against environmental pro-oxidants? **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 293-300. 2006.
- MORILLO, J.; USERO, J.; GRACIA, I. Biomonitoring of trace metals in a mine-polluted estuarine system (Spain). **Chemosphere**, v. 58, n. 10, p. 1421-1430. 2005.
- MORRISON, H. G. et al. Molecular cloning of CYP1A from the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analysis of CYP1 genes: update with new sequences. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 121, n. 1-3, p. 231-240. 1998.
- MUKAI, M.; TISCHKAU, S. A. Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: Searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 1, p. 172-181. 2007.
- MURPHY, K. A.; QUADRO, L.; WHITE, L. A. The intersection between the aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and retinoic acid-signaling pathways. **Vitamin A**, v. 75, n., p. 33-67. 2007.
- NASCI, C. et al. Induction of Cytochrome-P-450 and Mixed-Function Oxygenase Activity by Low Concentrations of Polychlorinated-Biphenyls in Marine Fish *Zosterisessor-Ophiocephalus* (Pall). **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 281-290. 1991.
- NAGATOMO, K.; FUJIWARA, S. Expression of Raldh2, Cyp26 and Hox-1 in normal and retinoic acid-treated *Ciona intestinalis* embryos. **Gene Expression Patterns**, v. 3, n. 3, p. 273-277. 2003.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; COSTAESOUZA, R. Determination of the Optimum Commercial Size for the Mangrove Oyster (*Crassostrea rhizophorae*) in Todos Os Santos Bay, Brazil. **Aquaculture**, v. 20, n. 1, p. 1-8. 1980.
- NASCIMENTO, I. A. et al. Stress protein accumulation as an indicator of impact by the petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management** v. 1, n., p. 101-108. 1998.
- NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1155-1162. 2002.
- NEBERT, D. W.; KARP, C. L. Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): Intersection of Cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized Eicosanoids and AHR Biology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 52, p. 36061-36065. 2008.
- NELSON, D. R. et al. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1-42. 1996.
- NELSON, D. R. Metazoan cytochrome P450 evolution. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, v. 121, n. 1-3, p. 15-22. 1998.
- NELSON, D. R. et al. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 1, p. 1-18. 2004.

NIYOGI, S. et al. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. **Science of the Total Environment**, v. 281, n. 1-3, p. 237-246. 2001.

NUNES, F.F. **Avaliação *in situ* da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina**. 2008. 52 f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

OHTAKE, Y. et al. Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. **British Journal of Ophthalmology**, v. 87, n. 3, p. 302-304. 2003.

PALMIERI, F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 689-709. 2004.

PAYNE, J. F. Field Evaluation of Benzopyrene Hydroxylase Induction as a Monitor for Marine Petroleum Pollution. **Science**, v. 191, n. 4230, p. 945-946. 1976.

PENTEADO, J. C. P.; SEOUD, O. A. E.; CARVALHO, L. R. F. Linear alkylbenzene sulfonates: Chemistry, environmental impact and analysis. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 1038-1046. 2006.

PEREIRA, M. D. Polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): Main sources, environmental behaviour and risk to man and biota. **Quimica Nova**, v. 27, n. 6, p. 934-943. 2004.

PERSSON, B. et al. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. **Chemico-Biological Interactions**, v. 178, n. 1-3, p. 94-98. 2009.

PETERS, L. D.; NASCI, C.; LIVINGSTONE, D. R. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus sp.* **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, v. 121, n. 1-3, p. 361-369. 1998.

PETERSON, G. L. Simplification of Protein Assay Method of Lowry Et Al - Which Is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356. 1977.

PFEIFER, S.; SCHIEDEK, D.; DIPPNER, J. W. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp* from the south-western Baltic Sea. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 320, n. 1, p. 93-103. 2005.

PFLUGMACHER, S. et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1425, n. 3, p. 527-533. 1998.

PICHAUD, N. et al. Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*. **Chemistry Central Journal**, v. 2, n., p. -. 2008.

PIE, M. R. et al. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; *Bivalvia* : *Ostreidae*) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 15, p. 1598-1600. 2006.

PLACE, S. P.; O'DONNELL, M. J.; HOFMANN, G. E. Gene expression in the intertidal mussel *Mytilus californianus*: physiological response to environmental factors on a biogeographic scale. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 356, n., p. 1-14. 2008.

- PINA, B.; CASADO, M.; QUIROS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145-1154. 2007.
- POWER, A.; SHEEHAN, D. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, v. 114, n. 2, p. 99-103. 1996.
- QUILANG, J. et al. Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. **Bmc Genomics**, v. 8, n., p. -. 2007.
- RAMNANAN, C. J.; STOREY, K. B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 7-16. 2006.
- RAND, G. M. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis. 1995. 1125 p.
- REBELO, M. D.; DO AMARAL, M. C. R.; PFEIFFER, W. C. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1354-1358. 2003.
- REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, Glutathione-Dependent and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Exposed to Metals under Field and Laboratory Conditions - Implications for the Use of Biochemical Biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 143-164. 1995.
- REGOLI, F. et al. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 912-922. 2002.
- REWITZ, K. F. et al. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 4, p. 363-381. 2006.
- RHEE, S. G. et al. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 5-6, p. 619-626. 2005.
- RICKWOOD, C. J.; GALLOWAY, T. S. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect - A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 45-56. 2004.
- ROMEO, M.; BARELLI, M. G. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, v. 118, n. 1, p. 33-37. 1997.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n., p. 1572-1574. 2003.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: S, K.S, M. **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. : Humana Press, Totowa, NJ, 2000, v., p. 365-386

- SAAVEDRA, C.; BACHERE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1-14. 2006.
- SAFE, S. H. Modulation of Gene-Expression and Endocrine Response Pathways by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin and Related-Compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 67, n. 2, p. 247-281. 1995.
- SAKAI, Y. et al. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. **Genes & Development**, v. 15, n. 2, p. 213-225. 2001.
- SANTOS, E. A. et al. Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusc *Anomalocardia brasiliiana*. In situ characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration. **Histochemical Journal**, v. 34, n. 11-12, p. 553-558. 2002.
- SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, n. 13, p. 2463-2476. 2006.
- SCHLEZINGER, J. J. et al. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 422-432. 2006.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108. 2008.
- SCHOBBER, W. et al. On the species-specific biotransformation of dibenzo[a,l]pyrene. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, n. 1, p. 37-48. 2006.
- SCOTTI, P. D. et al. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia : Mytilidae). **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 128, n. 4, p. 767-779. 2001.
- SCOTTI, P. D.; DEARING, S. C.; GREENWOOD, D. R. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 41, n. 1, p. 91-101. 2007.
- SEN, B.; MAHADEVAN, B.; DEMARINI, D. M. Transcriptional responses to complex mixtures - A review. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 636, n. 1-3, p. 144-177. 2007.
- SHAW, J. P. et al. Seasonal Variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 405-409. 2000.
- SHEADER, D. L. et al. Isolation of differentially expressed genes from contaminant exposed European flounder by suppressive, subtractive hybridisation. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2-5, p. 553-557. 2004.
- SHIMIZU, T. et al. Crystal-Structure of Vitelline Membrane Outer Layer Protein-I (Vmo-I) - a Folding Motif with Homologous Greek Key Structures Related by an Internal 3-Fold Symmetry. **Embo Journal**, v. 13, n. 5, p. 1003-1010. 1994.
- SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant Functions of Vitamins - Vitamin-E and Vitamin-C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 669, n., p. 7-20. 1992.

- SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D. Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae*: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. **Hydrobiologia**, v. 501, n. 1-3, p. 199-206. 2003.
- SMOLOWITZ, R. M.; SCHULTZ, M. E.; STEGEMAN, J. J. Cytochrome P4501a Induction in Tissues, Including Olfactory Epithelium, of Topminnows (*Poeciliopsis Spp*) by Waterborne Benzo[a]Pyrene. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 12, p. 2395-2402. 1992.
- SNYDER, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 529-547. 2000.
- SOLE, M.; NASCI, C.; LIVINGSTONE, D. R. Study of the biological impact of organic contaminants on mussels (*Mytilus galloprovincialis L.*) from the Venice Lagoon, Italy: responses of CYP1A-immunopositive protein and benzo(a)pyrene hydroxylase activity. **Biomarkers**, v. 5, n. 2, p. 129-140. 2000.
- SOLE, M.; LIVINGSTONE, D. R. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 20-31. 2005.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-2690. 2006.
- STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. **Systematic Biology**, v. 57, n. 5, p. 758-771. 2008.
- MCCRADY, M. H. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 56, n. 4, p. 684-. 1966.
- STEGEMAN, J. J.; TEAL, J. M. Accumulation, Release and Retention of Petroleum Hydrocarbons by Oyster *Crassostrea-Virginica*. **Marine Biology**, v. 22, n. 1, p. 37-44. 1973.
- STEGEMAN, J. J. Influence of Environmental Contamination on Cytochrome P-450 Mixed-Function Oxygenases in Fish: Implications for Recovery in the Wild Harbor Marsh. **J. Fish. Res. Board can.**, v. 35, n., p. 668-674. 1978.
- STEGEMAN, J. J. Benzo[a]Pyrene Oxidation and Microsomal-Enzyme Activity in the Mussel (*Mytilus edulis*) and Other Bivalve Mollusk Species from the Western North-Atlantic. **Marine Biology**, v. 89, n. 1, p. 21-30. 1985.
- STEGEMAN, J. J.; KLOEPPER-SAMS, P. J.; FARRINGTON, J. W. Monooxygenase induction and chlorobiphenyls in the deep sea fish *Coryphaenoides armatus*. **Science**, v. 231, n., p. 1287-1289. 1986.
- STEINKE, D.; SALZBURGER, W.; MEYER, A. Novel relationships among ten fish model species revealed based on a phylogenomic analysis using ESTs. **Journal of Molecular Evolution**, v. 62, n. 6, p. 772-784. 2006.
- STRAUB, P. F. et al. Suppression subtractive hybridization cDNA libraries to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats. **Marine Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 386-399. 2004.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1715-1733. 1996.

TANGUY, A. et al. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. **Gene**, v. 408, n. 1-2, p. 27-36. 2008.

TANIGUCHI, S. **Pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em bivalves ao longo da Costa Brasileira – International Mussel Watch**. 1995. 65 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

THAKUR, N. L. et al. Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 233-245. 2008.

TOLEDO-SILVA, G. et al. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 15-18. 2008.

TORRES, M. A. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 923-932. 2002.

TSUTSUMI, S. et al. Alkylbenzenes in mussels from South and South East Asian coasts as a molecular tool to assess sewage impact. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 325-331. 2002.

TUGIYONO; GAGNON, M. M. Metabolic disturbances in fish exposed to sodium pentachlorophenate (NaPCP) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126), individually or combined. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n. 4, p. 425-435. 2002.

TUN, K. L. et al. Seasonality in the infection and invasion of *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 80, n. 2, p. 157-165. 2008.

ULRICH, P. N.; BOON, J. K. The histological localization of heparin in the northern quahog clam, *Mercenaria mercenaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 3, p. 155-159. 2001.

UNO, T. et al. Bioconversion by functional P450 1A9 and P450 1C1 of *Anguilla japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 3, p. 278-285. 2008.

USEPA – **Guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories**. v. 2 – Risk Assessment and Fish consumption limits – 2. ed. U. S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. 1997.

VANVELD, P. A. et al. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo[a]pyrene. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 348-359. 1997.

VENIER, P. et al. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. **Bmc Genomics**, v. 10, n., p. -. 2009.

VENTURA, E.C. **Biomarcadores bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Scianidae), coletados na costa sudeste brasileira**. 2004. 115 f. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

VERSLYCKE, T.; GOLDSTONE, J. V.; STEGEMAN, J. J. Isolation and phylogeny of novel cytochrome P450 genes from tunicates (*Ciona spp.*): A CYP3 line in early deuterostomes? **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 3, p. 760-771. 2006.

- WALKER, C. H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis. 1996. 321 p.
- WALLNER-KERSANACH, M. et al. Accumulation and elimination of trace metals in a transplantation experiment with *Crassostrea rhizophorae*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 40-45. 2000.
- WANG, L.; SCHEFFLER, B. E.; WILLETT, K. L. CYP1C1 messenger RNA expression is inducible by benzo[a]pyrene in *Fundulus heteroclitus* embryos and adults. **Toxicological Sciences**, v. 93, n. 2, p. 331-340. 2006.
- WENNE, R. et al. What role for genomics in fisheries management and aquaculture? **Aquatic Living Resources**, v. 20, n. 3, p. 241-255. 2007.
- WIESNER, L. et al. Does an aryl hydrocarbon receptor (AHR)-like molecule exist in earthworms? Some implications for immunity. **Pedobiologia**, v. 47, n. 5-6, p. 646-650. 2003.
- WILLS, L. P. et al. Effect of CYP1A inhibition on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 195-201. 2009.
- WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 137-161. 1991.
- WOOTTON, A. N. et al. Evidence for the Existence of Cytochrome-P450 Gene Families (Cyp1a, 3a, 4a, 11a) and Modulation of Gene-Expression (Cyp1a) in the Mussel *Mytilus Spp*. **Marine Environmental Research**, v. 39, n. 1-4, p. 21-26. 1995.
- XU, C. J.; LI, C. Y. T.; KONG, A. N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 3, p. 249-268. 2005.
- YIN, H. C. et al. Influence of TCDD on zebrafish CYP1B1 transcription during development. **Toxicological Sciences**, v. 103, n. 1, p. 158-168. 2008.
- ZANETTE, J.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 187-195. 2006.
- ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-198. 2008.
- ZANETTE, J. et al. New Cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 Genes in the Killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal Expression and Response of Five Killifish CYP1 s to the AHR Agonist PCB126. **Aquatic Toxicology**, v. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.008, n., p. 2009.
- ZAPATA, M. et al. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. **Gene**, v. 442, n. 1-2, p. 37-46. 2009.
- ZERUTH, G.; POLLENZ, R. S. Functional analysis of cis-regulatory regions within the dioxin-inducible CYP1A promoter/enhancer region from zebrafish (*Danio rerio*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, n. 2, p. 100-113. 2007.
- II Workshop Regional Sul sobre o Mar. In: WORKSHOP REGIONAL SUL SOBRE O MAR: Repensando o Mar para o Século XXI, 2., 1998, Florianópolis. **Anais do II Workshop Regional Sul sobre o mar**. Florianópolis: UFSC, 1998. 113 p.