

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA &
BIOCIÊNCIAS**

Naissa Maria Danielli

**RESPOSTAS MOLECULARES EM TILÁPIAS DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) EXPOSTAS *IN SITU* A UMA
REGIÃO CONTAMINADA DA BACIA DO RIO CUBATÃO DO
NORTE, JOINVILLE, SC.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências,
Centro de Ciências Biológicas, da
Universidade do Federal de Santa
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso
Dias Bainy

FLORIANÓPOLIS

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Danielli, Naissa Maria
RESPOSTAS MOLECULARES EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS IN SITU A UMA REGIÃO CONTAMINADA DA BACIA DO RIO CUBATÃO DO NORTE, JOINVILLE, SC. / Naissa Maria Danielli ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy - Florianópolis, SC, 2013.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Ecotoxicologia. 3. Marcadores moleculares. 4. SSH. 5. Peixe. I. Bainy, Afonso Celso Dias . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

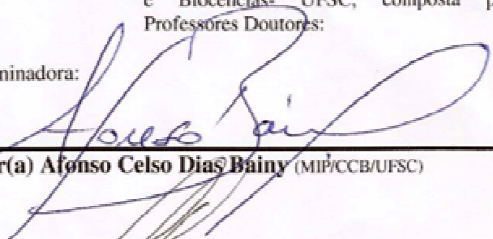
“Respostas moleculares em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas *in situ* a uma região contaminada da Bacia do Rio Cubatão do Norte, Joinville, SC”

por

Naissa Maria Danielli

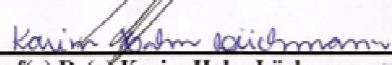
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 01/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:




Prof(a) Dr(a) Afonso Celso Dias Bairy (MIP/CCB/UFSC)

Prof(a) Dr(a) Maria Risoleta Freire Marques (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Karim Hahn Luchmann (CERES/UDESC)

Prof(a) Dr(a) Gilmar Sidnei Erzinger (Farmácia/Universidade da Região de Joinville)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de muito esforço e da companhia de muitas pessoas de grande valor ao meu lado.

Agradeço:

Aos meus pais que um dia sonharam e hoje compartilham este importante momento comigo. Obrigada por serem meu sólido alicerce em todos os momentos de minha vida. Nenhuma palavra nunca será suficiente para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim. Obrigada por tudo! Meus maiores exemplos na vida.

Ao Afonso, pela orientação na realização da dissertação, oportunidades que me foram concedidas e amizade em todo o período em que estive no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática; proporcionando todas as condições para meu crescimento profissional.

Ao Alcir, pela co-orientação, oportunidade deste projeto, companheirismo que admiro.

À Risoleta, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos;

À banca examinadora pela Aceitação do convite e atenção dada ao trabalho.

Aos colegas que fizeram parte da incansável batalha, que foram muito além das suas obrigações, essenciais para a realização desse trabalho. Muito obrigada: Alcir, Samira, Trevisan, Lila, Talita, Marcela.

Ao apoio fundamental, de grandes colegas, no incansável trabalho de campo: Alcir, Samira, Trevisan, Lila, Talita, Marcela, Jacó, Juliano, Elisa, Clei.

A Fundação Municipal 25 de Julho e a Roberto Hoppe, pelo fornecimento dos animais e de toda a estrutura para a realização dos experimentos.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, pela parceria nas análises químicas das amostras.

Ao Parque Integrado de Esportes, Lazer e Cultura Ltda-Kartódromo Internacional de Joinville, SC, por aceitarem e compreenderem a realização dos experimentos.

Ao senhor do alambique e ao casal de senhores que nos disponibilizaram a entrada de nossa equipe em suas propriedades para a realização dos experimentos.

Ao meu amado namorado Julio, que me apoiou e me ajudou muito neste último ano que foi tão difícil, longe da minha família e com muitas doenças que me perturbaram e dificultaram minha vida neste ano. Sem esta pessoa especial não teria terminado minha dissertação, muito obrigada.

A minhas amigas Rafaela, Daiane, Maya, Christiely, Dani, Karim pelo mútuo aprendizado de vida, durante nossa convivência, no campo profissional e particular, compartilhando comigo os momentos de tristezas e também de alegrias, nesta etapa, em que, com a graça de Deus, está sendo vencida.

Especialmente a Angelica Francesca Maris, e no passar desses anos uma grande amiga, foi minha maior incentivadora, agradeço muito por contribuir para minha formação e motivação profissional.

Aos integrantes e colegas do LABCAI, dentre os que não participam mais e os novos integrantes, foi muito bom conviver com vocês.

Ao apoio financeiro deste trabalho concedido pela CNPq, além da bolsa de DTI.

A bolsa REUNI concedida pelo programa de pós-graduação em Biotecnologia & Biociências.

E a todos aqueles que fazem de sua vida, uma luta diária pela melhoria deste mundo.

“Cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não havia pobreza no mundo e ninguém morreria de fome.”

“Há riqueza bastante no mundo para as necessidades do homem, mas não para a sua ambição.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A bacia hidrográfica do Rio Cubatão é o complexo hídrico mais importante da Baía da Babitonga. Está localizada na região nordeste do estado de Santa Catarina inserida em sua maior parte no município de Joinville. Esta bacia vem sofrendo degradação por ação antrópica decorrente de várias atividades socioeconômicas, as quais exercem impactos diretos na vegetação, no solo e na qualidade das águas nos vários afluentes que a compõem. As metodologias tradicionais de classificação de águas não são suficientes para identificar e quantificar as substâncias químicas na água. Para estabelecer métodos que possam evidenciar situações de risco ambiental, é de fundamental importância a aplicação de análises integradas da qualidade da água, unindo as respostas obtidas através dos métodos tradicionais de avaliação às respostas biológicas dos animais. Este trabalho avaliou respostas moleculares no fígado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidas em áreas contaminadas na Bacia do Rio Cubatão, no distrito industrial do local citado. Os locais de estudo foram três áreas no encontro do Rio Cubatão com o Rio do Braço e como local referência foi utilizada a Estação de Piscicultura. O experimento foi realizado no mês de outubro de 2009, e após o período de dois e sete dias de exposição os animais foram coletados para análise molecular, e para a análise química, onde para esta também foi coletado o sedimento de cada ponto de exposição. Como resultados das análises químicas observamos uma maior contaminação por esgoto doméstico e/ou poluentes químicos orgânicos, no local denominado S2, seguindo pelos locais S3, S1 e REF. Através da técnica de Hibridização Substrativa Supressiva (SSH) foi obtido um panorama da resposta da Tilápia do Nilo, frente aos contaminantes encontrados nos locais de exposição da Bacia. Foram identificados genes envolvidos em diversas funções biológicas, tais como cadeia respiratória, reparação de DNA, metabolismo de lipídios, estrutura celular, entre outros. Através da técnica de PCR quantitativo em tempo real foram realizados testes de validação de alguns genes escolhidos da lista obtida pelo SSH. Entre os resultados, foi observada uma diminuição da transcrição de genes que codificam proteínas do sistema imune sugerindo uma supressão deste, e a repressão de alguns genes nos animais expostos aos contaminantes. Estas informações poderão auxiliar na compreensão, de uma forma integrada, dos efeitos biológicos a nível transcricional causados pelos

contaminantes presentes no ambiente e auxiliando futuros programas de avaliação e monitoramento em recursos hídricos com suspeita de contaminação ambiental.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, SSH, Contaminantes.

ABSTRACT

The hydrographic basin of River Cubatão is the most important hydric complex at Baía da Babitonga. It is located in the Northeastern state of Santa Catarina, inserted mostly in the city of Joinville. This basin has suffered degradation by human action due to various socio-economic activities, which direct impacts on vegetation, soil and water quality in the various affluents that comprise it. The traditional methods of classifying waters are not enough to identify and quantify chemicals in the water. To establish methodologies that can demonstrate environmental risk, it is of fundamental importance to the application of integrated analysis of water quality, combining the responses obtained through the traditional methods for assessing the biological responses of animals. This study evaluated molecular responses in the liver of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) maintained in contaminated areas of Bacia do Rio Cubatão do Norte, in the industrial district of said local. The study sites were three areas in the Rio Cubatão meeting with Rio do Braço and reference site was used as the Fish Culture Station. The experiment was conducted in October 2009, and after a period of two and seven days of exposure the animals were collected for molecular analyses, and chemical analyses, for this was also where the sediment collected from each point of exposure. The results of chemical analysis found a higher contamination by domestic sewage and/or organic chemical pollutants at the site called S2, followed by local S3, S1 and REF. Through the technique Suppressive Subtractive Hybridization (SSH) was obtained an overview of the response of Nile tilapia, compared to contaminants found in local exposure Basin. We identified genes involved in several biological functions, such as respiratory chain, DNA repair, lipid metabolism, cell structure, among others. Finally, techniques using quantitative RT-PCR tests were performed to validate some genes chosen from the list obtained by SSH. Among the results was observed a decrease in the transcription of genes encoding proteins of the immune system suggesting a suppression of the immune system, and repression of certain genes in animals exposed to contaminants. This information may help to understand, in an integrated manner, the transcriptional level the biological effects caused by contaminants in the environment and help future programs of evaluation and monitoring water resources with suspected environmental contamination.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, SSH, Contaminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da região da bacia do Rio Cubatão, indicando os locais de referência (REF) e de exposição (S1, S2, S3).....	26
Figura 2. Eletroforese de RNA. Verificação da integridade do material (foi utilizado pool de amostras). Observam-se duas bandas que representam o RNA ribossomal 18S e 28S.....	30
Figura 3. Níveis de hidrocarbonetos alifáticos totais quantificados em amostras de sedimento coletadas na área referência e nos locais de estudo nos rios Cubatão e do Braço (Joinville, SC).....	38
Figura 4. Níveis de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (com e sem perileno) em amostras de sedimentos.....	39
Figura 5. Porcentagem do número total dos fragmentos obtidos na biblioteca de SSH dos genes induzidos de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas em áreas contaminadas da Bacia do Rio Cubatão e classificados por função biológica.	44
Figura 6. Porcentagem do número total dos fragmentos obtidos na biblioteca de SSH dos genes reprimidos de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas em áreas contaminadas da Bacia do Rio Cubatão e classificados por função biológica.....	45
Figura 7. Níveis de transcrição gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real dos genes induzidos pela técnica de SSH. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle que é representado pelo eixo Y. Os dados estão mostrados na forma de média e intervalo de erro, calculados pelo programa REST2009. <i>APPR</i> - Apolipoproteína AI; <i>TTN</i> - Tetraspanina 3; <i>AKD</i> - Alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada EI; <i>CGI</i> - Ciclina-G1; <i>CRP</i> - Ceruloplasmina; <i>CC3</i> - Componente complemento; <i>A2M</i> - Alfa-2-macroglobulina; <i>CNN</i> - Coriogenina L; <i>FAS</i> - Ácido Graxo sintase.....	58
Figura 8. Níveis de transcrição gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real dos genes reprimidos pela técnica de SSH. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle que é representado pelo eixo Y. Os dados estão mostrados na forma de média e intervalo de erro, calculados pelo programa REST2009. <i>RDY</i> - Retinol desidrogenase 3; <i>PPN</i> - Fator complemento properdina; <i>P450</i> - Citocromo p450 2j6; <i>WTA</i> - Aclimatação a temperatura alta; <i>FBG</i> - Fibrinogênio beta.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores das sequências selecionadas para validação por PCR quantitativo em tempo real.....	33
Tabela 2. Valores médios de temperatura, pH e O ₂ dissolvido da água em cada local de estudo após dois e sete dias de exposição das tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	36
Tabela 3. Peso e comprimento médio de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos durante dois e sete dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SCm.....	37
Tabela 4. Concentração de pesticidas organoclorados em amostras de sedimentos dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	40
Tabela 5. Concentração de esteróis em amostras de sedimentos dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	40
Tabela 6. Concentrações de contaminantes orgânicos em amostras de fígado de Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas por sete dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.....	41
Tabela 7. Concentração de metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no músculo de <i>Oreochromis niloticus</i> , mantidas por sete dias nos rios do Braço e Cubatão, Joinville, SC.....	42
Tabela 8. Lista de genes identificados como induzidos na técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH).....	47
Tabela 9. Lista de genes identificados como reprimidos na técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva.....	51
Tabela 10. Eficiência de cada reação de PCR quantitativo em tempo real de cada gene em amostras de fígado de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas por dois e sete dias em áreas contaminadas da Bacia do Rio Cubatão do Norte.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A2M – Alpha-2-macroglobulin
HAs – Hidrocarbonetos alifáticos (*Aliphatic hydrocarbon*)
AKD – Alpha-ketoacid dehydrogenase E1
APPR – Apolipoprotein AI
As – Arsênio
BCAKD – Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase
CC3 – Complement component C3
Cd – Cádmiio
CDKs – Proteína ciclina dependente outra quinase
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC
CG1 – Cyclin-G1
CNN – Choriogenin L
CPI – Índice de preferência de carbono
Cr – Cromo
CRP – Ceruloplasmin
Cu – Cobre
DDE – Diclorodifenildicloroetileno
DNA – Ácido desoxirribonucléico
cDNA – DNA complementar
DTT – Ditiotreitól
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FAS – Fatty acid synthase
FBG – Fibrinogen beta
Fe – Ferro
FURG – Universidade Federal do Rio Grande
GenBank – Banco de genes
Hg – Mercúrio
HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático (PAHs –*Polycyclic aromatic hydrocarbons*)
HPLC – Cromatógrafo líquido de alto desempenho
IPTG – Isopropylthio- β -galactoside
LAB – Alquilbenzeno lineares (*Linear alkylbenzene*)
Mn – Manganês
Ni – Níquel
O₂ – Oxigenio
OD – Oxigênio dissolvido
P450 – Cytochrome p450 2j6
Pb – Chumbo

PCBs – Bifenilas policlorados (*Polychlorinated biphenyls*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
PPN – Fator complemento factor properdina
RDY – Retinol dehydrogenase 3
pH – Potencial hidrogeniônico
RNA – Ácido ribonucléico
mRNA – RNA mensageiro
REF – Ponto referência na estação de piscicultura da Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC
S1, S2 ou S3 – Pontos de exposição dos animais na Bacia do Rio Cubatão, Joinville, SC
S18 – Ribosomo 18s
SEM – Materiais de referência certificados
SIM – Single ion monitoring
SSH – Hibridização Subtrativa Supressiva (*Suppression Subtractive Hybridization*)
TTN – Tetraspanin 3
USP – Universidade de São Paulo
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
X-Gal – 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside
Zn – Zinco
WTA – Warm temperature acclimation

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE BREVIATURAS DE SIGLAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Contaminação Ambiental.....	17
1.2 Contaminantes.....	18
1.3 Biomarcadores.....	20
1.4 Biomarcadores Moleculares.....	22
1.5 Local de estudo.....	23
1.6 Caracterização da espécie	24
2. OBJETIVO GERAL.....	25
2.1 Objetivos Específicos.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Área de estudo e desenho experimental.....	26
3.2 Biometria e extração de tecidos.....	27
3.3 Análises químicas de compostos orgânicos e inorgânicos.....	27
3.3.1 <i>Determinação de compostos orgânicos.....</i>	<i>27</i>
3.3.2 <i>Análise de metais por espectrofotometria de absorção atômica.....</i>	<i>29</i>
3.3.3 <i>Análise do mercúrio total pelo método de geração de vapor frio acoplado a sistema de espectrometria de absorção atômica.....</i>	<i>29</i>
3.4 Extração de RNA total e RNA mensageiro.....	30
3.5 Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)	31

3.6 Clonagem e Sequenciamento.....	32
3.7 PCR quantitativo em tempo real.....	33
3.8 Análises estatísticas.....	34
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Parâmetros químicos e físicos da água	36
4.2 Biometria dos peixes.....	36
4.3 Determinação de compostos orgânicos no sedimento dos locais de exposição.....	37
4.3.1 Hidrocarbonetos alifáticos.....	37
4.3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....	38
4.3.3 Alquilbenzeno Lineares (LABs).....	39
4.3.4 Pesticidas Organoclorados.....	39
4.3.5 Esteróis.....	40
4.4 Determinação de compostos orgânicos no fígado dos animais....	41
4.5 Metais.....	42
4.6 Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)	43
4.7 Análise dos níveis de transcrição dos genes de interesse	56
5. DISCUSSÃO.....	61
5.1 Parâmetros químicos e físicos da água.....	61
5.2 Parâmetros biológicos.....	61
5.3 Níveis de contaminantes.....	62
5.3.1 Hidrocarbonetos alifático.....	62
5.3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....	63
5.3.3 Alquilbenzeno lineares (LAB).....	63
5.3.4 Pesticidas Organoclorados (HCB).....	64
5.3.5 Esteróis.....	65
5.3.6 Análise de metais.....	65
5.4 Respostas moleculares.....	65

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação Ambiental

Nas últimas décadas o nível de substâncias químicas nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante como resultado das atividades humanas sobre o meio ambiente. Esta situação é particularmente notada nas áreas com elevadas densidades populacionais, onde os cursos d'água são modificados, recebendo esgotos industriais e domésticos, além de sedimentos, lixo, e subprodutos oriundos do uso intensivo dos recursos naturais pela agropecuária, silvicultura e mineração (MORENO & CALLISTO, 2005; ARIAS *et al.*, 2007).

O aumento populacional geograficamente desproporcional, que se concentra no litoral e em torno dos cursos hídricos, leva a alta demanda por água e conseqüentemente seu mau uso ao qual representam sérios e crescentes problemas que ameaçam o desenvolvimento sustentável e a proteção do ambiente (FITZHUGH e RICHTER, 2004).

A poluição aquática provém da adição de substâncias que alteram as características físicas e químicas do corpo d'água, e desta maneira prejudicando a utilização das suas águas para usos benéficos. Existem três formas de poluição a física, química e biológica. A poluição física altera as características físicas da água que decorre do lançamento de água aquecida nos rios usada no processo de refrigeração de refinarias, siderúrgicas e usinas termoelétricas ou também pode ocorrer através da poluição por resíduos pela presença de sólidos suspensos provenientes de esgotos industriais e domésticos e da erosão de solos. Entre os poluentes químicos temos aqueles que são biodegradáveis pela ação de bactérias e os persistentes que predominam no ambiente por muito tempo, como por exemplo, o DDT e o mercúrio. E por fim, a poluição biológica que é causada pela presença de organismos patogênicos que provocam infecções intestinais (PEREIRA, 2004).

Na tentativa de reverter este quadro, alguns países como o Brasil decidiram implementar novas tecnologias e elaborar normas mais rigorosas para o controle e monitoramento da qualidade da água. O Brasil possui uma das maiores reservas hídricas do mundo, concentrando cerca de 25% da água doce superficial disponível no planeta, no entanto uma parcela significativa desta não possui potabilidade (MAGALHÃES & CAMPOS, 2006)

Os aspectos de saúde e meio ambiente teve um maior avanço no Brasil a partir do século XX onde em 1934 foi elaborado o primeiro instrumento de controle do uso de recursos hídricos no país com a elaboração do Código das Águas, estabelecendo como prioritários o abastecimento público e preservação da qualidade da água em todo o território nacional que foi posteriormente estabelecida na Constituição Federal de 1988 (SOARES, BERNARDES, CORDEIRO NETTO, 2002). Hoje nos favorecemos da Resolução CONAMA No.357/2005 complementada pelas resoluções CONAMA N° 410/2009 e 430/2011, estabelecem as condições e padrões de lançamento de efluentes dependendo da classificação das águas, constituindo que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos na resolução e em outras normas aplicáveis.

No entanto, a elaboração de leis e normas ambientais, não garante o cumprimento da lei e o emprego de recursos financeiros em tecnologias eficientes que quantifiquem e remediem a contaminação da água em casos de poluição química (MAGALHÃES & CAMPOS, 2006).

Estas circunstâncias têm contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas; aumentando a probabilidade dos riscos de contaminação nos cursos d'água, um ônus imposto pelos padrões de conforto e bem-estar da vida moderna. Deste modo, os ecossistemas aquáticos urbanos vêm perdendo suas características naturais e sua diversidade biológica (MORENO & CALLISTO, 2005; ARIAS *et al.*, 2007).

1.2 Contaminantes

O ambiente aquático é continuamente carregado de contaminantes, produtos químicos de origem orgânica e/ou inorgânica provindos das comunidades urbanas, agrícolas e industriais. Há décadas vários desses poluentes vem sendo descartados continuamente no ambiente acarretando problemas aos organismos que habitam esses locais (PEREIRA, 2004). Dentre estes contaminantes temos os metais, bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos alifáticos (HAs), hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (HPAs), alquilbenzeno lineares (LABs), esteróis fecais, medicamentos, entre outros.

Os metais estão entre os contaminantes mais perigosos, sendo que alguns como o zinco (Zn), cobre (Cu) e o ferro (Fe) são micronutrientes essenciais para o desenvolvimento dos organismos aquáticos, requeridos em pequenas quantidades. Outros, mesmo em pequenas quantidades, são tóxicos, como o chumbo (Pb) e cádmio (Cd), mas de maneira geral, todos são tóxicos dependendo da concentração (BENDATI, 1997).

Um contaminante largamente utilizado da década de 20 por suas características físico-químicas (alta constante dielétrica e elevada estabilidade térmica) são as bifenilas policloradas (PCBs). Estes compostos são da classe dos organoclorados por possuírem cloro anidro em sua estrutura. Os PCBs foram utilizados principalmente em produtos como transformadores e capacitores, fluídos de transferência de calor e como aditivos na formulação de plastificantes, tintas, adesivos e pesticidas. Embora a utilização dos PCBs tenham sido banidos em vários países e também no Brasil, ainda é permitido que equipamentos já instalados continuem em funcionamento até sua substituição integral (PENTEADO & VAZ, 2001) .

O pesticidas organoclorados são poluentes hidrofóbicos persistentes que por esta característica acabam sendo bioacumulados nos tecidos dos organismos e conseqüentemente biomagnificado pelo consumo de alimentos contaminados. Mesmo sendo proibido em vários países o HCB é liberado no meio ambiente como um subproduto de vários processos industriais e o DDT ainda é usado no controle de vetores, programas destinados a malária, febre amarela, e leishmaniose. Apesar de vários anos de proibição e restrição, estes poluentes ainda persistem no ambiente, constituem um perigo a saúde dos organismos aquáticos e aos que se alimentam destes (MIRANDA *et al.*, 2008).

Um dos principais poluentes dos corpos d'água são os hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos (HPAs). A poluição por hidrocarboneto é de grande preocupação para a conservação dos recursos naturais, que em muitos casos sustenta as economias regionais por serem os principais componentes de petróleo bruto. Sua presença e concentrações elevadas freqüentemente criam preocupação ambiental em relação aos efeitos ecotoxicológicos. São substâncias muitas vezes hidrofóbicas e facilmente acumuladas nos organismos através das cadeias alimentares (COMMENDATORE *et al.*, 2012).

Alquilbenzeno lineares são amplamente utilizados como base para agentes de limpeza atuando como detergente e, portanto, são lançados no sistema de esgoto sanitário e industrial em todo o mundo. É

potencialmente prejudicial aos organismos vivos por causa da capacidade perturbar membranas e proteínas levando a desnaturação (ASOK & JISHA, 2012).

Além dos contaminantes químicos temos o esteróis que são biomarcadores de poluição fecal. Os esteróis fecais são aqueles derivados do colesterol, produzidos ainda no trato intestinal de animais superiores, considerado uma “impressão digital” possibilitando determinar a fonte da contaminação. O esterol mais abundante nas fezes é o coprostanol detectado na maioria das águas de superfície e sedimentos contaminada com esgoto. Sob condições anóxicas sedimentares, coprostanol irá persistir proporcionando sua detecção enquanto outras análises sobre estas condições não possibilitam sua detecção, como é o caso dos coliformes fecais (REEVES & PATTON, 2005).

A toxicidade destes poluentes pode causar a sérios problemas ambientais, particularmente, esses poluentes são suspeitos de causar hepatotoxicidade, supressão imunológica, neurotoxicidade, distúrbios da tireóide, toxicidade reprodutiva e carcinogenicidade. Afetando o desenvolvimento dos animais bem como a sobrevivência de uma comunidade inteira (MIRANDA *et al.*, 2008).

1.3 Biomarcadores

As metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para identificar e quantificar as substâncias químicas na água (KNIE & LOPES 2004). E o monitoramento ambiental por meio de análises químicas diretas de água e sedimento é limitado pela disponibilidade e sensibilidade dos métodos e por uma incapacidade para prever a toxicidade de misturas complexas (BOLOGNESI *et al.*, 2004). Então o conhecimento da toxicidade de agentes químicos em diferentes organismos aquáticos possibilita a observação direta da saúde dos mesmos e a detecção de efeitos nocivos sobre o ambiente aquático (SÄMY *et al.*, 2010).

Uma nova área da ciência surgiu para melhor avaliar esses efeitos causados pelas substâncias químicas e pelos agentes físicos liberados no ambiente sobre os organismos vivos denominada de Ecotoxicologia. Esta relaciona os efeitos adversos causados pelas substâncias químicas e pelos agentes físicos liberadas no ambiente sobre os organismos vivos,

analisando os efeitos adversos causados nos diferentes níveis de organização biológica, incluindo os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente (FENT, 2004; KNIE & LOPES 2004).

O biomonitoramento, através do uso de bioensaios determina o efeito dos poluentes, utilizando testes em sistemas biológicos a fatores estressantes, fornecendo promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar danos à saúde humana e ao ambiente (GALLOWAY *et al.*, 2004; KNIE & LOPES 2004). Estes ensaios podem ser avaliados através da medida de parâmetros biológicos denominados indicadores biológicos ou biomarcadores. Biomarcadores são as alterações biológicas adaptativas a estressores, como a exposição e o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente, que expressam alterações ao nível molecular, celular, fisiológico e até comportamental (WALKER *et al.*, 1996). Esses biomarcadores podem ser usados na avaliação ambiental, monitorando tanto a presença, como o potencial tóxico dos contaminantes muito antes do aparecimento de seus efeitos irreversíveis (AMORIM, 2003).

Amorim (2003) define como características essenciais para selecionar e validar um biomarcador. Este deve refletir a interação do sistema biológico com a substância química; ter conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade para a interação; ser reprodutível qualitativamente e quantitativamente; estar contido em um meio biológico acessível de análise; sua medição analítica tem que apresentar exatidão e precisão adequadas; devem ser claramente estabelecidos os valores normais deste biomarcador em populações não expostas ao agente químico de interesse.

O primeiro desafio na investigação de um biomarcador adequado para um melhor diagnóstico possível vai depender do contaminante a ser estudado e o organismo modelo. Dentre os principais organismos aquáticos utilizados como organismos sentinela, estão os peixes, moluscos e anfíbios (COTELLE & FÉRARD, 1999). Dentre estes, o uso de determinadas espécies de peixes é recomendado pela sua boa resistência em condições adversas, como pH extremo, baixos níveis de oxigênio dissolvido, variações de temperatura, presença de metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre outros (POPMA & MASSER, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2011; FRENZILLI *et al.*, 2009).

Como exemplo tem a Tilápia (*Oreochromis niloticus*), o qual é um organismo qualificado para avaliações de biomonitoramento ambiental devido a sua resistência em águas de má qualidade, com

baixas temperaturas, alta concentração de amônia, baixo oxigênio dissolvido e uma faixa de pH entre 5 e 10 (POPMA & MASSER, 1999).

Para o estabelecimento de metodologias eficazes que evidenciem situações de risco ambiental, é de fundamental importância o uso integrado de análises da qualidade de água, com metodologias tradicionais de avaliação das alterações biológicas em animais, juntamente com respostas moleculares e/ou bioquímicas frente a ambientes contaminados (ARIAS *et al.*, 2007).

1.4 Biomarcadores moleculares

A exposição de um organismo a poluentes pode desencadear uma cascata de respostas biológicas, cada uma das quais tem o potencial de servir como um biomarcador. Alterações biológicas visíveis a nível de comunidade, população ou ecossistema são precedidas por mudanças anteriores a níveis moleculares, antecipando assim as alterações nos níveis mais elevados de organização biológica. Sendo que, uma vez que os efeitos adversos em níveis hierárquicos superiores (população ou comunidade) são detectados, danos significativos podem já ter ocorrido. Portanto, a identificação precoce prevê aumento do risco dos efeitos adversos após a exposição a substâncias químicas ambientais, dando importância a utilização de biomarcadores moleculares (NOGUEIRA, 2009).

O uso de técnicas da biologia molecular aplicada à ecotoxicologia e monitoramento ambiental fornece informações em um nível de organização biológica diferente das demais técnicas e permite uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos contaminantes nos organismos vivos (BRULLE *et al.*, 2008; KOSKINEN *et al.*, 2004).

As alterações nos perfis de transcrição gênica fornecem informações sobre a interação dos estressores ambientais ao genoma, servindo como ferramenta poderosa para diagnosticar a existência de um estresse ambiental e para analisar as respostas biológicas que este provoca em uma determinada população (BRULLE *et al.*, 2008; KOSKINEN *et al.*, 2004).

Uma técnica molecular bastante utilizada em estudos toxicológicos é a Hibridização Substrativa Supressiva (SSH) que permite identificar de forma global os genes diferencialmente transcritos, induzidos ou reprimidos, entre duas situações distintas. Sendo assim, pode ser usada para entender os efeitos biológicos e prever os

mecanismos de ação de uma substância química em escala transcricional do genoma como um todo, quando comparada a uma situação controle (BRULLE *et al.*, 2008; QU *et al.*, 2011).

Por isto, esta técnica foi considerada adequada para estudar o efeito dos contaminantes da Bacia do Cubatão, possibilitando fornecer informações inéditas sobre o efeito combinado dos poluentes presentes num sistema biológico de forma global, possibilitando verificar os locais mais afetados, os quais podem ser inferidos pelos genes cuja transcrição sofre alterações nos animais expostos.

1.5 Local de estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão é o complexo hídrico mais importante da Baía da Babitonga. Localizada na região nordeste do estado de Santa Catarina, compreende uma área de 40,96 Km² inserida em sua maior parte no município de Joinville e uma menor porção no município de Garuva. Os rios Quiriri, da Prata, e o do Braço são os principais afluentes do Rio Cubatão (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O Rio Cubatão é o principal curso d'água e manancial da região e serve como fonte de captação de água para abastecimento da cidade de Joinville. Apesar da grande importância para a população, somente no seu terço superior a qualidade da água do rio é considerada boa, nos demais cursos, estas são utilizadas para a irrigação, agropecuária, bem como corpo receptor de efluentes domésticos e industriais (OLIVEIRA *et al.*, 2009; ZONOTELLI *et al.*, 2009).

A degradação da qualidade da água por problemas de poluição no Rio Cubatão fica mais explícita na sub-bacia do Rio do Braço, comprometida pelos afluentes do Distrito Industrial de Joinville (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esta região vem sofrendo com contaminações principalmente de metais como cádmio, chumbo, cobre, cromo, e níquel além de baixas concentrações de oxigênio dissolvido observados em um estudo da UNIVILLE (2004).

De modo geral esta bacia vem sofrendo degradação por ação antrópica decorrente de atividades socioeconômicas, as quais exercem impactos diretos na vegetação, no solo e na qualidade das águas nos vários afluentes que a compõem. As atividades com maior impacto sobre os recursos hídricos locais são as indústrias farmacêuticas, metal-mecânica, plásticos, têxtil e, principalmente, as indústrias de galvanoplastia, além de esgotos domésticos, oficinas mecânicas e

lavação de postos de gasolina. A crescente urbanização e industrialização levam ao constante aumento do volume dos efluentes industriais e resíduos sólidos, assim como o uso de agrotóxicos nas lavouras de arroz, a drenagem insuficiente de água pluvial, a ineficiência na coleta e tratamento de esgoto que muitas vezes é lançado nos cursos d'água sem o tratamento adequado (ALVES, 2003; ZONOTELLI *et al.*, 2009).

1.6 Caracterização da espécie

Nome científico: *Oreochromis niloticus*

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

O peixe *Oreochromis niloticus* é conhecido popularmente no Brasil como Tilápia, possui o hábito alimentar fitoplanctófago e onívoro, podendo atingir um comprimento de 60 cm e peso médio de 4,3kg. É um animal de hábitos diurnos e ocorre em uma grande variedade de habitats de água doce como rios, lagos, canais, esgotos e canais de irrigação. A espécie é nativa da África, tendo sido introduzida no nordeste brasileiro em 1971 (BOSCOLO *et al.*, 2001; CANABARRO & TOLEDO, 2010; OLIVEIRA, 2010).

Devido a sua resistência em águas de má qualidade, com baixas temperaturas, alta concentrações de amônia, baixo oxigênio dissolvido e uma faixa de pH entre 5 e 10, a Tilápia constitui-se em um organismo qualificado para avaliações de biomonitoramento ambiental (POPMA & MASSER, 1999).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar genes diferencialmente transcritos e verificar alterações na resposta da transcrição gênica em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas *in situ* em regiões contaminadas da Bacia do Rio Cubatão no distrito industrial de Joinville, SC.

2.1 Objetivos Específicos

- Clonar e identificar genes diferencialmente transcritos em fígado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas em locais contaminados da Bacia do Rio Cubatão do Norte;

- Classificar os genes identificados a partir de sua função biológica, para uma melhor caracterização do perfil de transcrição gênica;

- Avaliar a transcrição gênica a partir de técnicas quantitativas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e desenho experimental

Para a realização deste estudo, Tilápias do Nilo adultas (*Oreochromis niloticus*) foram fornecidas pela estação de piscicultura da Fundação Municipal de Desenvolvimento Rural 25 de Julho (Joinville/SC). Os animais foram previamente aclimatados e mantidos em grupos de dez em gaiolas de 1,2x1x1 metro (comprimento, largura, altura) no mesmo local por aproximadamente três semanas, com o intuito de reduzir o estresse provocado pelo confinamento.

Os locais de estudo foram três áreas do Complexo Hídrico da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão em Joinville, Santa Catarina, e como local referência foi utilizada a Estação de Piscicultura referida ($26^{\circ}12'13''\text{S}$ - $48^{\circ}55'12''\text{W}$), (sua localização esta indicada como REF na **Figura 1**), onde os animais também foram mantidos em gaiolas. O local denominado S1 ($26^{\circ}11'51''\text{S}$ - $48^{\circ}47'57''\text{W}$) se encontra no Rio Cubatão antes do encontro do Rio do Braço, S2 ($26^{\circ}12'24''\text{S}$ - $48^{\circ}47'44''\text{W}$) se localiza no Rio do Braço e S3 ($26^{\circ}11'54''\text{S}$ - $48^{\circ}46'38''\text{W}$) no Rio Cubatão após o encontro com o Rio do Braço (**Figura 1**), que sofre grande influência de atividades industriais.

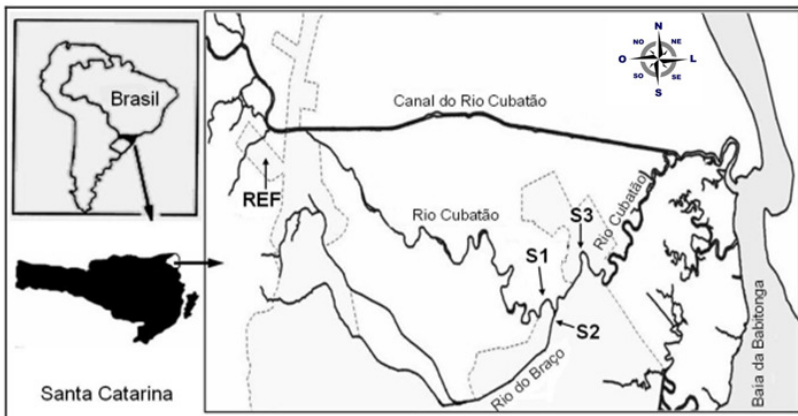


Figura 1. Representação da região da bacia do Rio Cubatão, indicando os locais de referência (REF) e de exposição (S1, S2, S3).

Para o bem estar dos animais, os mesmos foram transportados a cada local de exposição em sacos plásticos oxigenados em água do próprio açude da estação com temperatura aproximada de 20 a 22 °C. Foram utilizados somente machos pesando entre de 110 a 313 g e medindo 17 a 25 cm.

O experimento foi realizado no mês de outubro de 2009, quando foram colocadas duas gaiolas em cada local, para serem coletadas após dois e sete dias de exposição. Durante o período de exposição os animais não foram alimentados. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA PP00039).

3.2 Biometria e extração de tecidos

Após período de exposição, em média 6 a 8 (obs:Alguns foram predados) peixes foram coletados e transportados em sacos plásticos com água e oxigenados, levados à Fundação e acondicionados em tanques de 2000 L de água até a dissecação. Primeiramente os animais foram pesados e medidos. Então eles foram mortos por meio de secção transversal da medula espinhal e retirado amostras fígado para as análises bioquímicas, moleculares e químicas, e amostras de músculo somente para a análise química.

As análises bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Defesas Celulares, UFSC; a análise de química orgânica pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo - USP; a análise de metais foi realizado pelo Departamento de Química da FURG e a análise molecular que é objeto do presente trabalho.

Na água de todos os locais foram medidos o pH, os níveis de oxigênio dissolvido e a temperatura, utilizando-se um kit portátil de análise de água de campo. Amostras de sedimentos e água do rio foram coletados em recipientes apropriados para análise dos compostos orgânicos e metais traços.

3.3 Análises químicas de compostos orgânicos e inorgânicos

3.3.1 Determinação de compostos orgânicos

As amostras de sedimento foram secas durante 72 horas em liofilizador (Thermo Savant – ModulyoD). Em seguida, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente. Uma alíquota de 20 gramas de sedimento e 0,25 gramas do fígado de peixe foram extraídas em sistema Soxhlet para análise dos bifenilas policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos alifáticos (HAs), aromáticos (HPAs) e alquilbenzeno lineares (LABs) com n-hexano/diclorometano 50 % (v/v) segundo método descrito pela UNEP (1992), Matos (2002) e MacLeod *et al.* (1986) com algumas modificações. Antes da extração foram adicionados os padrões *surrogate* PCB-103, PCB-198, naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂, perileno-d₁₂, dodecil alquilbenzeno (1C₁₂LAB), hexadeceno e eicoseno em todas as amostras, brancos e materiais de referência certificados (SRM).

O extrato do sedimento foi dividido em duas alíquotas para serem submetidas à cromatografia por adsorção em coluna. Uma parte foi eluída para análise de organoclorados e a outra fração para análise de hidrocarbonetos alifáticos (HAs), LABs, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). As amostras foram injetadas 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 (UNEP, 1992; MATOS, 2002; MACLEOD *et al.*, 1986).

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás (6890 da Agilent Technologies) equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) para análise de pesticidas organoclorados e com detector de ionização de chama (GC-FID) 6890 para análise de HAs. Os demais grupos de compostos (HPAs, PCBs e LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC/MS) 6890/5973N também da empresa citada. A aquisição dos dados foi feita em SIM (*single ion monitoring*).

Os esteroides foram extraídos de 20 g de sedimento também por Soxhlet por 8 horas contendo etanol e α -colestano como padrão *surrogate* segundo procedimento de Kawakami e Montone (2002). A identificação e quantificação foram feitas em GC-MS, sendo que a aquisição foi feita em SCAN.

As identificações dos pesticidas, HAs, HPAs, PCBs, LABs e esteróides foram feitas por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard e Supelco dos EUA, Fluka da

Suíça e Sigma-Aldrich da Alemanha. A quantificação foi entre os *surrogates* e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos cinco concentrações diferentes de cada grupo de compostos. Os compostos analisados no GC/MS também foram identificados através do íon de quantificação (m/z) e seus respectivos íons de confirmação.

3.3.2 Análise de metais por espectrofotometria de absorção atômica.

As amostras biológicas de músculo foram tratadas com ácido nítrico concentrado para a total decomposição da amostra e solubilização de todos os metais, segundo descrito no *Reference Methods for Marine Pollution Studies* - UNEP (1984a).

O procedimento foi realizado com a digestão em chapa aquecedora. As amostras biológicas liofilizada foram agitadas por aproximadamente 2 minutos para homogeneização. Após 2 minutos foi pesado aproximadamente 0,1 a 0,5 g do tecido liofilizado nas bombas de Teflon[®]. Adicionado 5 mL de HNO₃ concentrado, a temperatura ambiente por pelo menos 1 hora. Os tubos de polipropileno foram fechados e colocados sobre a chapa quente a 100 °C por 3 horas. Com as amostras já resfriadas a temperatura ambiente, estas amostras que estavam em tubos de polipropileno foram abertas cuidadosamente no interior de uma capela e transferidas dos frascos de digestão para tubos de polipropilenos graduados. Então os frascos foram lavados com água Milli-Q, três vezes, adicionando esta água aos tubos graduados e diluído até a marca de 25 mL com água Milli-Q e agitado. A análise e leituras das amostras se procederam conforme as normas de operações do aparelho de espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.3.3 Análise do mercúrio total pelo método de geração de vapor frio acoplado ao sistema de espectrometria de absorção atômica

O método é aplicável a amostras biológicas com concentrações de mercúrio total com cerca de $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Foi empregada uma digestão forte para decompor a amostra e oxidar e converter todas as formas de mercúrio orgânico em mercúrio inorgânico. O método descrito é uma

adaptação do *Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 8* - UNEP (1984b), apresentado de forma detalhada em Ustra (2001).

O procedimento iniciou com 0,2 a 2 g de amostra seca em um tubo de Teflon[®] com tampa. Foi adicionado 5 mL de ácido nítrico concentrado e deixado em repouso por uma hora na temperatura ambiente. Aquecido em placa por 3 horas a 90 °C. Com as amostras já resfriadas, estas foram transferidas para um balão volumétrico e adicionado 20 mL de água Milli-Q e 1 mL de solução de K₂Cr₂O₇ (concentração final 2% v/v). Diluído com água Milli-Q até a marca do balão e esperado sedimentar. A análise e leituras das amostras se procederam conforme as normas de operações do aparelho de espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.4 Extração de RNA total e RNA mensageiro

A extração de RNA total foi realizada a partir de 200 mg de cada amostra de fígado, previamente armazenada em RNAlater[®] (Invitrogen) a -20 °C através do método que utiliza o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. A pureza, concentração e integridade do RNA total foram analisadas por espectrofotometria utilizando o aparelho Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a 260, 280 e 320 nm e através do perfil eletroforético em gel de agarose (Fig.2).

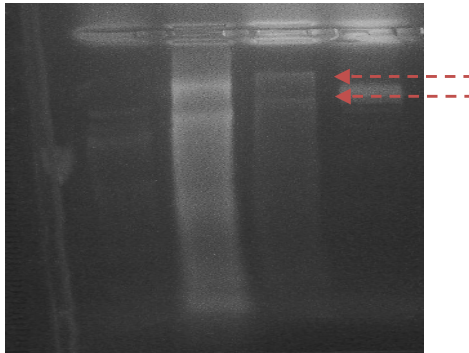


Figura 2. Eletroforese de RNA. Verificação da integridade do material (foi utilizado pool de amostras). Observam-se duas bandas que representam o RNA ribossomal 18S e 28S.

Para a obtenção do RNA mensageiro (RNAm) foi preparado um *pool* de 8 amostras de peixes do local referência e um *pool* de 8 amostras do local S2, (tempo de exposição, dois dias) usando o *kit PolyA mRNA* (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. Este método utiliza o fato do RNAm ter em sua estrutura uma calda POLI AAA, ou seja, de nucleotídeos de adenina, podendo assim isolar os RNAs mensageiros a partir de uma mistura complexa de vários outros tipos de RNAs.

Escolheu-se o período de dois dias de exposição pelo fato dos biomarcadores moleculares serem rapidamente ativados e reprimidos quando os organismos são expostos a contaminantes. E somente foi utilizado amostras do local S2 para ser avaliado juntamente com o local REF, pois em estudos anteriores o local S2 apresentou-se mais poluído, além do fato de que, a técnica de SSH só permite avaliar dois grupos por análise.

3.5 Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)

Na Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) foi utilizado o *kit PCR Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech) que é um método baseado em reações de PCR. A técnica inicia-se a partir de 1 µg de cada uma das amostras de mRNA (referência e exposto) que são convertidas a cDNA.

Os cDNAs expressos diferencialmente (alvo) estão presentes no cDNA *tester* e ausentes no cDNA *driver*. Os cDNAs são primeiro digeridos com uma enzima de restrição produzindo extremidades não coesivas. Os fragmentos de cDNA *tester* são então divididos em duas amostras (1 e 2) e ligados a dois adaptadores diferentes (adaptador 1 e 2), resultando em duas populações de *tester*, (1) e (2). São realizadas duas hibridizações na técnica de SSH. Primeiro, um excesso do *driver* é adicionado a cada amostra do *tester*. As amostras são então desnaturadas e colocadas para anelar. Nesta primeira hibridização ocorre vários tipos de ligação entre as fitas de cDNA, fita senso e anti-senso com adaptador, sem adaptador e fitas simples com e sem adaptador.

Na segunda hibridização, as duas amostras oriundas da primeira hibridização são misturadas. Apenas o restante dos cDNAs fita simples com adaptadores e subtraídos está apto a reassociar e formar híbridos que possuem sequências diferentes de adaptadores em sua extremidade 5'. Uma extremidade é proveniente da amostra 1 e a outra da amostra 2.

As duas sequências permitem a amplificação preferencial da fração normalizada e subtraída usando PCR e um par de “*primers*” (iniciadores), P1 e P2, os quais correspondem à parte externa do adaptador 1 e 2, respectivamente.

Para realizar esta amplificação seletiva, uma reação de extensão é realizada para preencher as extremidades desencontradas (coesivas) das moléculas para o anelamento do “*primer*” antes da iniciação do procedimento de PCR. Em todos os ciclos da reação de PCR, a amplificação exponencial pode ocorrer em moléculas híbridas que possuem sequências diferentes de adaptadores em sua extremidade 5'. Somente as moléculas que têm sequências de adaptadores diferentes nas suas extremidades as quais permitem que eles sejam exponencialmente amplificados por meio da reação de PCR (ANEXO 1). Ou seja, as sequências não hibridizadas, representam os genes que foram transcritos na amostra exposta, mas não foram na referência, ou inversamente, assim possibilitando obter transcritos diferencialmente expressos entre as amostras.

3.6 Clonagem e Sequenciamento

As amostras obtidas pela utilização da técnica de SSH foram ligadas nos vetores *pGEM-T Easy*® (Promega) pela enzima T4 DNA ligase, em seguida foi realizada a transformação das células competentes *E.coli* DH5- α , através de choque térmico.

As bactérias competentes foram cultivadas em placas de petri contendo meio de cultura sólido (Agar 35 g/l, LB Agar –Sigma; ampicilina, 100 mM; IPTG, 0,5 mM e X-Gal, 50mM) e deixadas a 37 °C por 18 h para crescimento de colônias. Após o período de cultivo as colônias visualmente da cor branca foram selecionadas e passadas para um meio de cultura líquido 20 g/l (LB Broth - Sigma) com ampicilina (100 mM), durante 18h a 37 °C em agitação constante. Destas amostras foi extraído e purificado o DNA utilizando o kit Qiagen Miniprep (Qiagen).

O sequenciamento das amostras de subtração foi realizado no equipamento *ABI3300*® (*Applied Biosystems*), para determinação das sequências gênicas expressas durante o experimento. Elas foram obtidas através de uma reação de PCR com a incorporação do corante fluorescente *BigDye Terminator v3.1*® (*Applied Biosystems*) utilizando

os iniciadores M13F ou M13R que alinham a uma região localizada próxima ao inserto no vetor *pGEM-T® Easy* (Promega).

Os genes homólogos foram identificados no banco de dado disponível (*GeneBank*), através do software BLAST (www.ncbi.nih.gov/blast) e escolhido os genes de interesse para validação por PCR quantitativo em tempo real.

3.7 PCR quantitativo em tempo real

A partir das sequências dos genes de interesse identificados através da SSH (**Tabela 1**), foram desenhados iniciadores específicos para cada sequência pelo programa FastPCR e padronizados para validação por PCR quantitativo em tempo real. Para este também foi obtido o RNA total pelo método do reagente *TRIZOL®* (Invitrogen) e o cDNA pelo *kit Omniscrip RT* da Qiagen (de acordo com as instruções do fabricante), para as amostras de cada local e tempo de exposição. Para a determinação da pureza e concentração do RNA total foi utilizado o espectrofotômetro NanodropND-1000 UV-Vis (Nanodrop technologies), a 260, 280 e 320 nm.

Tabela 1. Iniciadores das sequências selecionadas para validação por PCR quantitativo em tempo real.

GENE	SIGLA	PRIMER 5' – 3'
<i>Apolipoproteína AI</i>	APPR	TGTCGGTACAGGAGCAACGGAA ACTCAGGCGAAGGAGGGTGC
<i>Tetraspanina 3</i>	TTN	AGCGTGTGTGCTGCCAGTCTGAGTA ACAAATAGCAACGCCAGAGCCGT
<i>Alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada E1</i>	AKD	TCCCGCACATCTTTGAGCCCTTCT TTTCTGGCTGCTCCTCACTGTCT
<i>Ciclina-G1</i>	CG1	CACCAACTCTTAATTGTGGACACCG CAAACACTACACAGGGAACTGGCAC
<i>Ceruloplasmina</i>	CRP	ACAGCATGGGTCAGTTCGAGGTGGT TCCCAGGTTCCGTTTGGAGCGTAGT
<i>Componente complemento c3</i>	CC3	GGACAAGGTTTCTCACACACGACCAG TTCCAGCTTCCCTCTGTGGATGGT
<i>Alfa-2-macroglobulina</i>	A2M	TGGCATGAAGGGAGGAGTGAGTGA GCAGGTACAGGTTATCGAGCTGGC
<i>Coriogenina L</i>	CNN	TGGGATCATGCGCTGTGTCCGAGA ATCACAGGAAACCACCCAGGCT
<i>Ácido graxo sintase</i>	FAS	GAGTAGTTAGTATGCAGAAACACGGCTGG AGG TTTCCACATGCAGACACCAGTAGACAGGC
<i>Retinol desidrogenase 3</i>	RDY	ATGACAGCTCCGCCTCAACAT TGCCCATAGTCGCTTCACTTCC
<i>Citocromo p450 2j6</i>	P450	CCTGGGATTCCCAGATGTGCCAAT CCCCTCACTTGTCAAGCAGCAGCG

<i>Fator complemento properdina</i>	PPN	ACCTGACCGAGAGACGAGTGTGCT ACGAGGAGGGTAAAGTTGTAGCCGGT
<i>Aclimação a temperatura quente</i>	WTA	TGCAGGTCTTGAGATGGATGCTGT CAGCGAAACTCTTATTGGAGAAGCTCGGC
<i>Fibrinogênio beta</i>	FBG	AGGGAGACCTTCGCTGGAATAGA CAACTGGAGCAGGAGTAGGGC
<i>Proteína Ribossomal 18s</i>	S18	TACCACATCCAAAGAAGGCA TCGATCCCGAGATCCAATA

Foi utilizado o método de quantificação por detecção não específica com *SYBR® Green*, fluoróforo fluorescente que se liga à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência. Cada amostra foi analisada em duplicata com o seguinte protocolo: 95 °C por 5 min e 35 ciclos de 95 °C por 10 s e 60 °C por 30 s. Gerada a curva de *melting*, que ao emitir apenas um pico de fluorescência para cada amostra, foi confirmada a amplificação de um único produto de PCR. Foram considerados válidas as reações iguais ou próximas dos valores de 100% para a eficiência da reação e 1,0 para o valor de R^2 , este indica que a reação se mantém com eficiência semelhante em cada concentração de cDNA da curva. Ao final o *software (Rotor Gene 6000)* obtemos o valor do número de ciclos de limiar o Ct (*Ciclo Threshold*), o qual é o número de ciclos a que a amostra atravessa o limiar.

Dentre os normalizadores avaliados, que foram a actina, tubulina e G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase) somente o ribossomo 18S foi selecionado por não apresentar variação na transcrição dos animais mantidos no local de referência e os locais avaliados, após dois e sete dias de exposição.

3.8 Análises estatísticas

O cálculo da transcrição dos genes foi realizado utilizando o *software REST 2009* da QIAGEN® através dos dados de Ct de cada gene e os gráficos confeccionados pelo programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.01. O programa REST aplica um modelo matemático de randomização, ou seja, atribuição de um modo aleatório a assegurar uma distribuição igual para cada grupo do estudo, adequado a comparação da expressão para cada amostra.

A análise dos parâmetros químicos e físicos da água e concentração de metais foi realizada primeiramente a análise de distribuição normal e após a análise de variância (ANOVA) de uma via,

seguida do teste post hoc de Duncan, quando necessário. Para os dados biométricos foi utilizado o Teste não paramétrico Kruskal-Walis seguido do teste complementar de Dunns. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros químicos e físicos da água

Os parâmetros químicos e físicos de qualidade da água dos diferentes locais experimentais foram analisados após dois e sete dias de exposição. Os valores de temperatura, pH e O₂ dissolvido estão apresentados na Tabela 2. Nenhuma diferença significativa na temperatura, pH e O₂ dissolvido foi observada entre os locais de exposição em relação ao local utilizado como referência.

Tabela 2. Valores médios de temperatura, pH e O₂ dissolvido da água em cada local de estudo após dois e sete dias de exposição das tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

Pontos	Temperatura (°C)	pH	O 2 dissolvido (mg/l)
REF	21,6 ± 2,4	6,6 ± 0,2	7,1 ± 2,2
S1	20,7 ± 1,7	6,0 ± 0,4	7,6 ± 1
S2	20,7 ± 1,5	6,5 ± 0,3	5,8 ± 1,2
S3	21,7 ± 1,1	5,4 ± 0,8	7,3 ± 1,1

REF indica o local de referência em que os animais foram mantidos (Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC) e, S1, S2 e S3, os locais de exposição dos animais nos rios Cubatão e do Braço. Os dados representam a média ± erro padrão. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido por teste post hoc de Dunnet para comparação dos dados entre os locais ($p < 0,05$).

4.2 Biometria dos peixes

A biometria dos peixes mantidos por dois e sete dias de exposição nos locais experimentais podem ser visualizados na Tabela 3. O número de animais por grupo não foi o mesmo, pois no dia das coletas verificamos que houve predação desses animais. Apesar deste fator, não observamos nenhuma diferença significativa no comprimento e peso dos peixes dos grupos de exposição S1, S2 e S3 em relação ao local de Referência.

Tabela 3. Peso e comprimento médio de *Oreochromis niloticus* expostos durante dois e sete dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

Grupo	Número por grupo	Peso (g)	Comprimento (cm)
<u>Dois dias</u>			
REF	10	184,2 ± 71,3	20,40 ± 3,4
S1	7	146,1 ± 44,8	19,14 ± 1,7
S2	10	205,2 ± 47,9	22,50 ± 1,6
S3	10	163,7 ± 48,65	20,20 ± 1,7
<u>Sete dias</u>			
REF	10	203,5 ± 65,9	21,50 ± 2,0
S1	10	173,6 ± 57,1	20,20 ± 1,9
S2	7	151,4 ± 17,9	19,86 ± 1,2
S3	6	147,9 ± 48,2	19,00 ± 1,8

REF indica o local de referência em que os animais foram mantidos (Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC) e, S1, S2 e S3, os locais de exposição dos animais nos rios Cubatão e do Braço. Os dados representam a média ± erro padrão. Foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste complementar de Dunns ($p < 0,05$).

4.3 Determinação de compostos orgânicos no sedimento dos locais de exposição.

4.3.1 Hidrocarbonetos alifáticos

Os Hidrocarbonetos alifáticos podem ser de origem antrópica ou natural. Um dos parâmetros para avaliar a presença de fontes biogênicas é através da análise da razão pristano/fitano, com valores que variam entre 3 e 5 (STEINHAUER & BOEHM, 1992). Essa razão apresentou um intervalo de 1,10 a 203 $\mu\text{g.g}^{-1}$ nas amostras de sedimento analisadas (ANEXO 2), e somente as estações S2 e S3 indicaram uma introdução antrópica na região.

A concentração de hidrocarbonetos alifáticos totais encontrados nas amostras de sedimento de Joinville variou de 2,40 a 203 $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso

seco. A concentração mais alta foi encontrada na amostra da estação S2 (**Figura 3**).

Hidrocarbonetos alifáticos totais em sedimento - Joinville

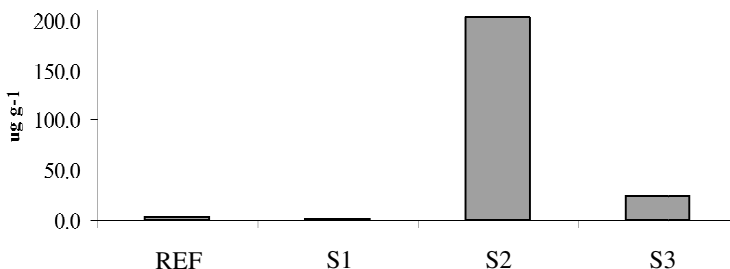


Figura 3. Níveis de hidrocarbonetos alifáticos totais quantificados em amostras de sedimento coletadas na área referência e nos locais de estudo nos rios Cubatão e do Braço (Joinville, SC).

4.3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Os maiores níveis de HPAs totais no sedimento foram observados no local S2, seguido pela amostra S3 (**Figura 4**). As concentrações de HPAs apresentaram uma variação de 11,6 a 1179 ng.g⁻¹ (**ANEXO 3**). Em relação aos HPAs com perileno também foram encontradas as maiores concentrações nas amostras de sedimento dos locais S2 e S3 (**Figura 4**). HPAs com perileno significa que a amostra é derivada de fontes diferentes da combustão de material orgânico, atribuídas a fontes naturais (VENKATESAN, 1988).

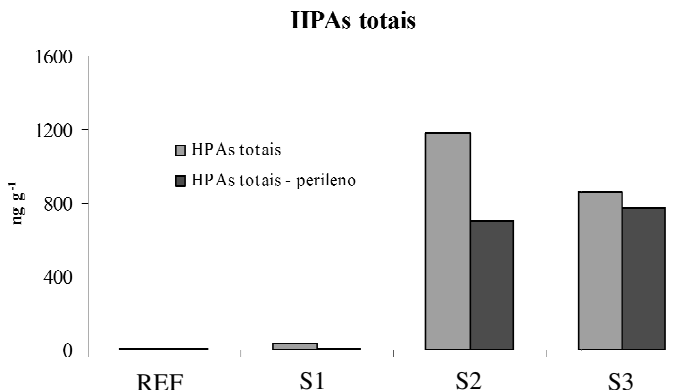


Figura 4. Níveis de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (com e sem perileno) em amostras de sedimentos.

4.3.3 Alquilbenzeno Lineares (LABs)

Os níveis de LABs totais quantificados nas amostras dos sedimentos do local S2 foi 655 ng.g⁻¹ e do local S3 foi 19,2 ng.g⁻¹. A amostra do local S1 apresentou valores abaixo do limite de detecção e o local referência apresentou níveis de 6,84 ng.g⁻¹.

4.3.4 Pesticidas Organoclorados

Concentrações consideravelmente baixas de DDTs totais (0,15 a 2,25 ng.g⁻¹) foram encontradas nas amostras do local REF, S2 e S3, sendo que no local S2 foi observada a maior concentração, indicando a presença de resíduos deste produto (**Tabela 4**). Entretanto, não há informações a respeito da sua utilização nessa região recentemente. Possivelmente estas concentrações de DDT podem estar relacionadas a sua persistência no ambiente, bem como, sua utilização ilegal em agrotóxicos.

Tabela 4. Concentração de pesticidas organoclorados em amostras de sedimentos dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

	REF	S1	S2	S3
<u>Pesticidas Organoclorados (ng.g⁻¹)</u>				
p,p'-DDE	0,5	0,15	0,68	0,22
p,p'-DDT	1,22	<0,37	0,68	0,64
DDTs totais	2,07	0,15	2,25	1,02

REF indica o local de referência em que os animais foram mantidos (Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC) e, S1, S2 e S3, os locais de exposição dos animais nos rios Cubatão e do Braço.

4.3.5 Esteróis

A presença de esterol na água é um indicador de poluição fecal que é fonte de descarga dos efluentes domésticos. Coprostanol é um esterol fecal gerado através da ação microbiana sobre o colesterol. Segundo Gonzalez-Oreja e Saiz-Salinas (1998) níveis de coprostanol acima de 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ indicam altos níveis de contaminação por esgoto sanitário no ambiente. Com exceção do local S1, todos os locais amostrados apresentaram concentração de coprostanol acima ou muito próximo desse limite de 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (**Tabela 5**).

Tabela 5. Concentração de esteróis em amostras de sedimentos dos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

	REF	S1	S2	S3
<u>Esteróis ($\mu\text{g.g}^{-1}$)</u>				
Coprostanol	0,46	0,15	9,12	1,38
Epicoprostanol	0,23	0,04	0,50	0,19
Coprostanona	0,45	0,19	6,57	1,84
Colestanona	0,09	0,16	0,25	0,57
Colestanol	1,62	0,79	2,10	1,68
Esteróis totais	19,1	10,5	32,3	14,3
<u>Relações</u>				
Coprostanol/(coprostanol+colestanol)	0,22	0,16	0,81	0,45
coprostanona/(coprostanona+colestanona)	0,83	0,55	0,96	0,76

REF indica o local de referência em que os animais foram mantidos (Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC) e, S1, S2 e S3, os locais de exposição dos animais nos rios Cubatão e do Braço.

A amostra do local S2 apresentou a maior razão de coprostanol/ (coprostanol + colestanol) de 0,81, seguido do local S3, com valores de 0,45, sendo que razões entre 0,70 a 1,0 indicam um local contaminado por esgoto (GRIMALT *et al.*, 1990).

4.4 Determinação de compostos orgânicos no fígado dos animais

As concentrações de contaminantes orgânicos no fígado dos animais mantidos nos diferentes locais de estudo podem ser visualizadas na Tabela 6. Os níveis de PCBs, organoclorados e esteróis apresentaram-se abaixo do limite de detecção do método (dados não mostrados). Os níveis de HPAs totais apresentaram uma variação de 74,3 a 348 ng.g^{-1} (peso úmido). As maiores concentrações foram detectadas no fígado dos animais mantidos no local S2 seguido de S1, S3 e referência. Todas as amostras dos peixes apresentaram níveis significativos de LABs no fígado. Quando os dados são normalizados por grama de lipídios, os maiores valores observados foram nas amostras do local S2, mas quando os dados são normalizados por grama de tecido, os maiores níveis foram observados nos peixes do local referência, indicando a presença de algum tipo de contaminação por detergentes nesta região.

Tabela 6. Concentrações de contaminantes orgânicos em amostras de fígado de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por sete dias nos Rios Cubatão e do Braço, Joinville, SC.

	REF	S1	S2	S3
HPAs Totais ng.g^{-1} de tecido	74,3	348	309	172
ΣHPAs Totais $\mu\text{g.g}^{-1}$ lipídios	563	4581	7720	2257
LABs Totais ng.g^{-1} de tecido	326	203	195	260
ΣLABs Totais $\mu\text{g.g}^{-1}$ lipídios	2.47	3.43	4.89	2.67
Alifáticos Totais $\mu\text{g.g}^{-1}$	11.2	139	2.35	19.2
Alcanos Totais $\mu\text{g.g}^{-1}$	5.35	5.24	2.35	3.95

REF indica o local de referência dos animais na Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC e S1, S2, S3 os locais de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço.

As maiores concentrações de hidrocarbonetos alifáticos totais foram observadas no fígado dos peixes mantidos no local S1. Os peixes do local REF também apresentaram os maiores níveis de alcanos totais.

4.5 Metais

A concentração dos metais no músculo dos animais pode ser visualizada na Tabela 7. A determinação de metais foi realizada pelo Departamento de Química da FURG utilizando amostras coletadas após sete dias de exposição. Somente o manganês quantificado no músculo dos peixes mantidos nos locais S1 e S3, e o zinco nos peixes dos locais S1, S2 e S3 apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle.

Tabela 7. Concentração de metais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no músculo de *Oreochromis niloticus*, mantidas por sete dias nos rios do Braço e Cubatão, Joinville, SC.

	REF	S1	S2	S3
Metais				
Mn	1,40 ± 0,47	9,02 ± 0,68***	1,68 ± 1,18	4,18 ± 2,50*
Cr	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,15	0,14 ± 0,03	0,26 ± 0,26
Cd	< ldm ^c	< ldm	< ldm	< ldm
Ni	0,62 ± 0,33	0,22 ± 0,05	0,56 ± 0,33	0,51 ± 0,44
Pb	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,02
Cu	1,67 ± 0,55	2,58 ± 0,60	2,02 ± 0,90	2,16 ± 0,56
As	0,08 ± 0,05	0,10 ± 0,06	0,05 ± 0,00	0,23 ± 0,19
Hg	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Fe	29,68 ± 1,75	29,22 ± 3,36	25,77 ± 2,63	25,45 ± 3,28
Zn	16,52 ± 4,34	8,03 ± 1,40**	9,75 ± 3,00**	8,98 ± 2,32**

REF indica o local de referência dos animais (Fundação Municipal de Extensão Rural 25 de Julho, Joinville, SC), e S1, S2, S3 os locais de exposição dos animais nos Rios Cubatão e do Braço. c < limite de detecção do método. Os dados representam a média ± erro padrão. ANOVA de uma via seguido por teste post hoc de Duncan (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)

4.6 Híbridização Subtrativa Supressiva (SSH)

Para identificar os genes diferencialmente transcritos nos animais expostos a um local do rio Cubatão foi utilizada a técnica de SSH, onde dois *pools* de amostras de mRNA foram extraídos do fígado dos peixes mantidos por 48 h, respectivamente, nos locais referência e S2. Foi obtida uma biblioteca subtrativa com 369 clones entre os genes induzidos e reprimidos sendo que 102 sequências apresentaram-se de qualidade e similaridade com os genes já descritos no banco de genes (*GenBank*). Dentre estes, 66 foram induzidos (**Tabela 8**) e 36 reprimidos (**Tabela 9**).

As Figuras 5 e 6 apresentam as sequências anotadas que foram classificadas segundo suas respectivas funções biológicas, como sistema imune, cadeia respiratória, proteínas ribossomais, regulação de ácidos nucleicos, metabolismo de lipídios, ciclo celular, proteínas de sinalização, estrutura celular, mitocondrial, reparação de DNA, reciclagem de aminoácidos, inibidor de protease, metabolismo de metais, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, ativador de fase II, fototransdução, transporte celular, osmoregulação, regulação hormonal.

As descrições dos genes homólogos se encontram em mais detalhes nas Tabelas 8 e 9, apresentando o número de acesso no *GenBank*, *e-value* e tamanho do fragmento.

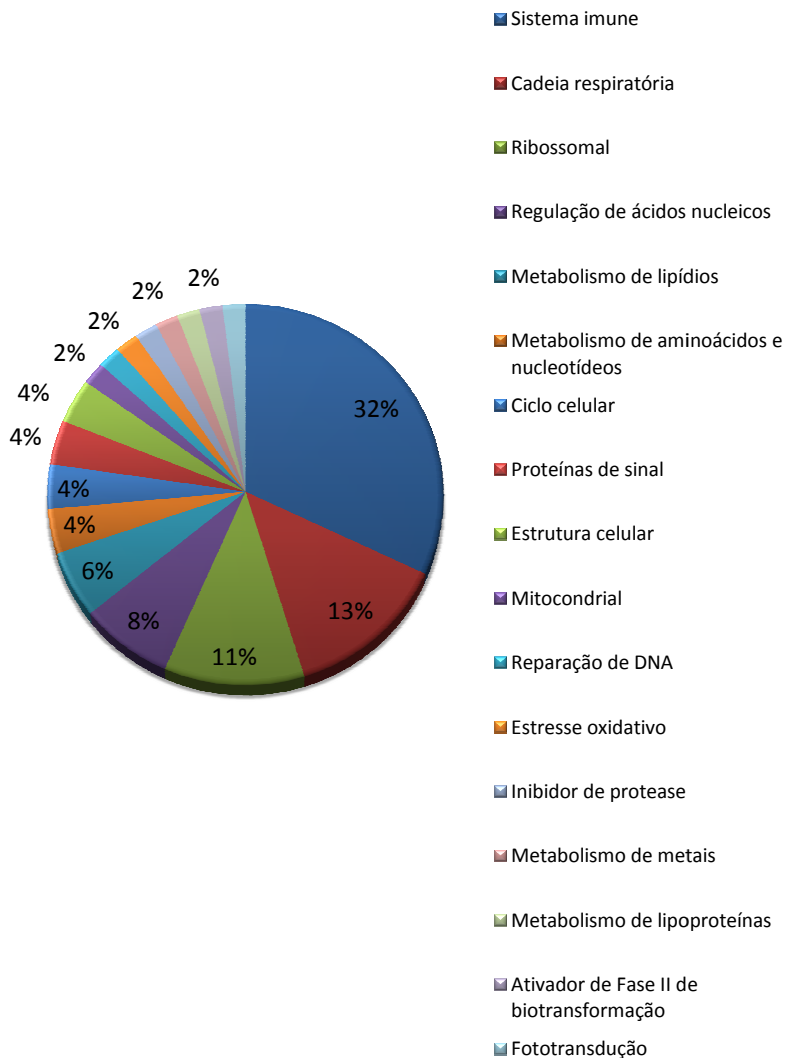


Figura 5. Porcentagem do número total dos fragmentos obtidos na biblioteca de SSH dos genes induzidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas em áreas contaminadas da Bacia do Rio Cubatão e classificados por função biológica.

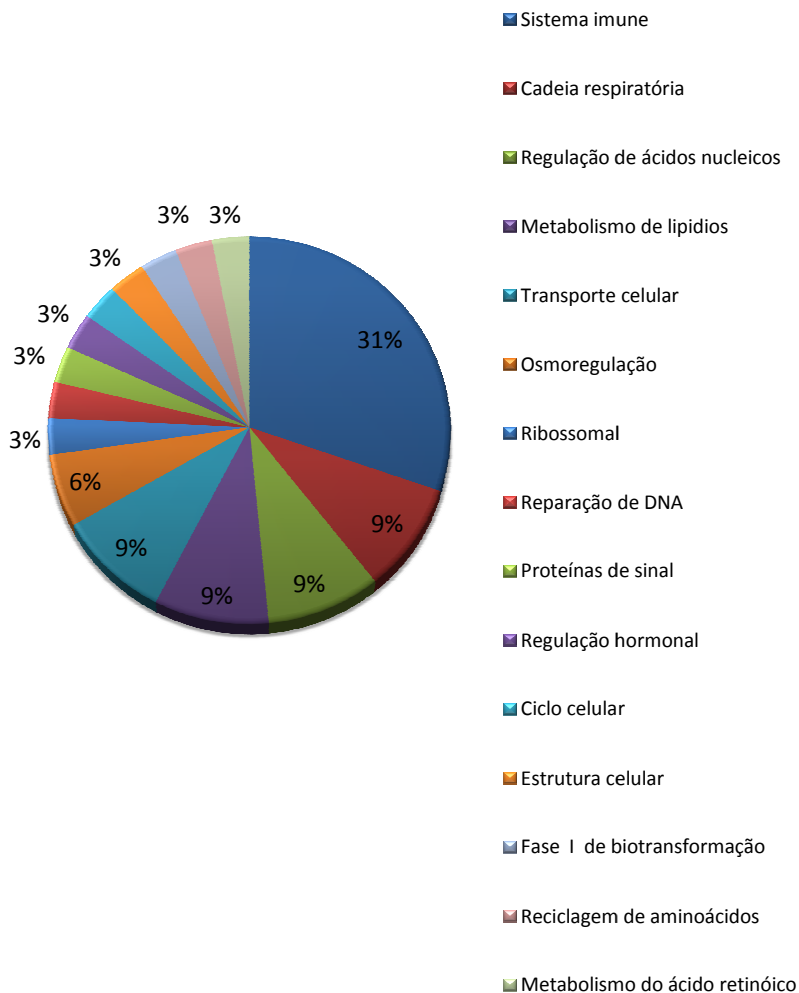


Figura 6. Porcentagem do número total dos fragmentos obtidos na biblioteca de SSH dos genes reprimidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas em áreas contaminadas da Bacia do Rio Cubatão e classificados por função biológica.

Tabela 8. Lista de genes identificados como induzidos na técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH).

Gene	Espécie Homóloga	Acesso GenBank	e-value	pb	Referência
<u>1.Sistema imune</u>					
<i>Alfa-2-macroglobulina-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003457659.1	6,22E-45	610	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Antitrombina III-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003448825.1	2,90E-120	617	BO <i>et al.</i> , 2012
<i>Apolipoproteína</i>	<i>Lates calcarifer</i>	ABA33614.1	3,02E-35	666	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Apolipoproteína 14 kda</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450542.1	2,44E-76	632	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Apolipoproteína A-I</i>	<i>Morone saxatilis</i>	ACH90228.1	1,49E-47	432	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Apolipoproteína A-I</i>	<i>Morone saxatilis</i>	ACH90229.1	2,65E-24	650	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Apolipoproteína c-ii</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450543.1	1,93E-08	502	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Componente complemento c3</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003460368.1	6,16E-59	606	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Componente complemento c3</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450066.1	2,39E-83	494	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Componente complemento c7-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003440256.1	6,25E-28	243	STRAUB <i>et al.</i> , 2004
<i>Componente complemento c9</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003449697.1	8,03E-73	454	XU <i>et al.</i> , 2010
<i>Proteína deletada em tumor cerebral maligno 1-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003440719.1	8,65E-67	432	OLSVIK <i>et al.</i> , 2011
<i>Precursor da proteína ligante a Galectina-3</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAG00217.1	2,07E-08	204	MORGA <i>et al.</i> , 2010
<i>Proteína ligante a Hialuronano-2</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	CBN81454.1	5,01E-02	671	PEREIRO <i>et al.</i> , 2012
<i>Cadeia pesada H3 do inibidor de inter-alfa-tripsina -like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003454640.1	5,64E-24	678	STRAUB <i>et al.</i> , 2004
<i>Isoforma CRA_b de Tetraspanina 3</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003440465.1	1,12E-20	638	BOUTETA, LONG KY, BONHOMME, 2006
<i>Proteína gelo-estruturante tipo 2</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003455907.1	2,66E-57	580	BOUTETA, LONG KY, BONHOMME, 2006
<u>2.Cadeia respiratória</u>					
<i>Subunidade 6 F0 ATP sintase</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	ADD84697.1	7,30E-23	233	MARCHAND <i>et al.</i> , 2006
<i>Citocromo b</i>	<i>Branchiostoma floridae</i>	XP_002600951.1	3,64E-21	732	BOUTETA, LONG KY,

<i>Citocromo c oxidase subunidade II</i>	<i>Oreochromis sp.</i>	YP_003587624.1	2,16E-50	655	BONHOMME, 2006
<i>Citocromo c oxidase subunidade III</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	YP_003355028.1	4,20E-74	416	BO <i>et al.</i> , 2012
<i>Citocromo c oxidase subunidade 7B, mitocondrial-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	BT079257.1	8,76E-08	572	BO <i>et al.</i> , 2012
<i>Citocromo oxidase subunidade parcial</i>	<i>Ptychochromis sp. 'Sofia'</i>	AAW66173.1	4,44E-41	260	TANGUY <i>et al.</i> , 2005
<i>NADH desidrogenase subunidade 4</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	ADB43199.1	7,22E-102	662	BO <i>et al.</i> , 2012
<u>3. Ribossomal</u>					
<i>16S ribossomal RNA</i>	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	GU574706.1	4,77E-108	646	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>40S ribossomal proteína S13</i>	<i>Esox lucius</i>	ACO13747.1	1,40E-30	564	OFFEN, MEYER, BEGEMANN, 2009
<i>40S ribossomal proteína S9-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450729.1	3,34E-71	384	OFFEN, MEYER, BEGEMANN, 2009
<i>Isolado iolsaicl2ct4cn4 ribossomal proteína L22</i>	<i>Argopecten irradians</i>	AF526199.1	1,21E-63	645	COLLIN <i>et al.</i> , 2010
<i>Provável proteína de biogênese ribossomal RLP24-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003443857.1	2,88E-18	632	MARCHAND <i>et al.</i> , 2006
<i>Proteína ribossomal s9</i>	<i>Oncorhynchus masou rhodurus</i>	ADK11698.1	3,13E-40	234	OFFEN, MEYER, BEGEMANN, 2009
<u>4. Metabolismo de lípidios</u>					
<i>Acil-coenzima A tioesterase 3-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003458502.1	1,79E-89	480	MORAIS <i>et al.</i> , 2012
<i>Ácido Graxo sintase variante 1</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003454055.1	6,27E-114	612	CRUZ-GARCIA <i>et al.</i> , 2011
<i>Stearoil-coa dessaturase</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	AAN77732.1	2,00E-67	351	CRUZ-GARCIA <i>et al.</i> , 2011
<u>5. Metabolismo de lipoproteínas</u>					
<i>Lipase Hepática</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003442316.1	4,41E-109	500	LIANG, TALL, 2001

6. Ciclo celular

<i>Ciclina G1 sensível a aminopeptidase puromicina</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003454172.1	1,09E-05	604	CHEN <i>et al.</i> , 2011
<i>Ciclina-G1-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003455167.1	2,97E-66	648	LANAHAN <i>et al.</i> , 2006

7. Proteína de sinal

<i>Fetúina B</i>	<i>Carassius gibelio</i>	ABA33614.1	3,02E-35	478	MARCHAND <i>et al.</i> , 2006
<i>Fetúina B</i>	<i>Carassius gibelio</i>	ABA33614.1	9,40E-13	622	MARCHAND <i>et al.</i> , 2006

8.Mitocondrial

<i>Mitocondria, genoma completo</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	AY905542.2	9,80E-19	370	QU <i>et al.</i> , 2011
-------------------------------------	------------------------------	------------	----------	-----	-------------------------

9.Reparação de DNA

<i>Endonuclease III-like mRNA sequência parcial</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	AY522626.1	9,68E-70	603	COLLINS, AI-GUO, DUTHIE, 1995
---	--------------------------------	------------	----------	-----	-------------------------------

10.Regulação de Ácidos nucleicos

<i>Fator de transcrição básico 3</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003451133.1	2,90E-90	500	FENG <i>et al.</i> , 2009
<i>Fator de alongamento gama1</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003444636.1	1,03E-49	270	COLLIN <i>et al.</i> , 2010
<i>Ribonucleoproteína a b nuclear heterogênea</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003453476.1	2,82E-64	323	YAOWU, SMITH, 2009
<i>Subunidade regulatória 3C-B da proteína fosfatase 1</i>	<i>Danio rerio</i>	XP_003455717.1	8,25E-78	508	OFFEN, MEYER, BEGEMANN, 2009

11.Estrutura celular

<i>Cadeia alfa de Fibrinogênio</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003455593.1	3,38E-87	517	QU <i>et al.</i> , 2011
------------------------------------	------------------------------	----------------	----------	-----	-------------------------

12. Armazenamento de oxigênio muscular

<i>Mioglobina</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	BAH19314.1	4,39E-94	657	BO <i>et al.</i> , 2012
-------------------	------------------------------	------------	----------	-----	-------------------------

13. Inibidor de protease

<i>Heparina cofator 2-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003451073.1	4,45E-115	654	AUSLANDER <i>et al.</i> , 2008
--------------------------------	------------------------------	----------------	-----------	-----	--------------------------------

14. Metabolismo de metais

<i>Transferrina</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	ABB70391.1	4,19E-12	646	QU <i>et al.</i> , 2011
<i>Ceruloplasmina</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003458996.1	6,47E-101	596	QU <i>et al.</i> , 2011

15. Metabolismo de Aminoácidos e nucleotídeos

<i>Subunidade E1-beta da alfacetoácido de cadeia ramificada desidrogenase de Urato oxidase</i>	<i>Homo sapiens</i>	AAB09779.1	1,08E-20	634	ABEBE, SKADSEN, KAEPLER, 2004
	<i>Salmo salar</i>	AAZ92542.1	7,76E-19	193	CALDUCH-GINER <i>et al.</i> , 2010

16. Ativador de Fase II

<i>Proteína I-like associada a ECH Kelch-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003442916.1	4,02E-72	386	KOTURBASH, BELAND, POGRIBNY, 2012
---	------------------------------	----------------	----------	-----	-----------------------------------

17. Fototransdução

<i>RH2B opsina, RH2A alfa opsina, e RH2A beta opsina</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	JF262086.1	1,09E-10	382	LENZNER <i>et al.</i> , 2002
--	------------------------------	------------	----------	-----	------------------------------

18. Reprodução

<i>Coriogenina L</i>	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	ACL00860.1	4,28E-90	655	PINTO <i>et al.</i> , 2006, a
----------------------	--------------------------------	------------	----------	-----	-------------------------------

19. Função desconhecida

<i>Proteína hipotética LOC100707181</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003445302.1	6,95E-13	338	
---	------------------------------	----------------	----------	-----	--

Proteína hipotética LOC100705516	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003451261.1	2,96E-20	626
Proteína hipotética LOC100710425	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003452158.1	4,30E-139	659
Proteína hipotética LOC100694740	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003439310.1	8,61E-08	648
Proteína hipotética LOC100707181	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003445302.1	3,06E-32	315
Proteína hipotética LOC100706742	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003445631.1	1,26E-48	506
Proteína hipotética LOC100707181	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003445302.1	1,76E-12	499
Proteína hipotética LOC100690055	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003453510.1	1,34E-14	233
Proteína hipotética	<i>Epinephelus bruneus</i>	AEB31301.1	9,22E-46	506
Loc494811 proteína	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003445302.1	5,19E-110	497
Sequências sDNA Poplar		CT028787.1	3,41E-07	634
Proteína transmembrana 82	<i>Ictalurus punctatus</i>	NP_001188056.1	7,25E-61	497

Tabela 9. Lista de genes identificados como reprimidos na técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH).

Gene	Espécie	Acesso GenBank	e-value	pb	Referência
<u>1. Sistema imune</u>					
Apolipoproteína 14 kda	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450542.1	7,03E-77	532	QU <i>et al.</i> , 2011
Fator de coagulação v	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003449639.1	4,07E-81	475	BO <i>et al.</i> , 2012
Componente complemento c1r-like	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003450690.1	7,34E-93	541	PEREIRO <i>et al.</i> , 2012
Componente complemento c3	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003460434.1	5,67E-80	391	QU <i>et al.</i> , 2011
Fator complemento h-like	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003453586.1	7,59E-87	411	BO <i>et al.</i> , 2012
Fator complemento properdina	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003442472.1	2,67E-88	422	BO <i>et al.</i> , 2012
Precursor de Fibronectina	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003443385.1	3,18E-39	531	CHANG <i>et al.</i> , 2005
Componente complemento 3 de nova	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	CAF95354.1	3,52E-43	331	STRAUB <i>et al.</i> , 2004

proteína de vertebrados

<i>Precursor de perforina-1</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003457818.1	1,69E-41	408	AUSLANDER <i>et al.</i> , 2008
<i>Proteína de 65kDa relacionada a aclimação a temperatura quente</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	DAA12503.1	2,12E-16	529	BO <i>et al.</i> , 2012

2. Cadeia respiratória

<i>ATP sintase 6</i>	<i>Oreochromis sp.</i>	ADT63732.1	4,19E-27	471	BOUTETA, LONG KY, BONHOMME, 2006
<i>ATP sintase 6</i>	<i>Lamprologus signatus</i>	ACN67250.1	4,83E-30	264	BOUTETA, LONG KY, BONHOMME, 2006
<i>Citocromo c oxidase subunidade i</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	YP_003406692.1	2,48E-42	390	BO <i>et al.</i> , 2012

3. Ribossomal

<i>60s proteína ribossomal 15</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003444299.1	5,70E-48	478	OFFEN, MEYER, BEGEMANN, 2009
-----------------------------------	------------------------------	----------------	----------	-----	------------------------------

4. Regulação de Ácidos Nucleicos

<i>Proteína tob1</i>	<i>Danio rerio</i>	NP_938177.1	1,87E-16	322	DIOS <i>et al.</i> , 2007
<i>Proteína de dedos de Zinco 729-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003459288.1	4,83E-04	517	BO <i>et al.</i> , 2012
<i>Proteína de dedos de Zinco 235-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003448728.1	5,27E-06	527	BO <i>et al.</i> , 2012

5. Reparação de DNA

<i>Domínio 1 da endonuclease da nova proteína de vertebrados</i>	<i>Danio rerio</i>	CAN87950.1	6,13E-12	536	COLLINS, AI-GUO, DUTHIE, 1995
--	--------------------	------------	----------	-----	-------------------------------

6. Metabolismo de lipídios

<i>Citocromo p450 2j6-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003447087.1	3,10E-95	467	SMITH <i>et al.</i> , 2008
<i>Citocromo P450 2j2-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003439934.1	2,80E-90	531	SMITH <i>et al.</i> , 2008
<i>Precursor ácido graxo acil CoA hidrolase de cadeia média-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003439585.1	4,20E-53	284	MORAIS <i>et al.</i> 2012

7. Transporte celular

<i>ADP ATP translocase 2</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003446896.1	1,21E-17	215	BO <i>et al.</i> , 2012
<i>Família de transportadores de solutos 25 membro 21</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003443081.1	5,60E-14	465	HAITINA <i>et al.</i> , 2006
<i>Acil-coa sintetase de cadeia muito longa</i>	<i>Rachycentron canadum</i>	ACV32407.1	1,34E-62	450	HAITINA <i>et al.</i> , 2006

8. Osmoregulação

<i>Precursor de Angiotensinogênio</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003438333.1	1,02E-81	527	BOUTETA, LONG KY, BONHOMME, 2006
<i>Enzima conversora de andotelina 1-like</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003447732.1	4,75E-95	532	BOUTETA, LONG KY, BONHOMME, 2006

9. Fase I de biotransformação

<i>Aldeído desidrogenase família 9 membro al-a</i>	<i>danio rerio</i>	CAQ13317.1	1,37E-43	445	LIN <i>et al.</i> , 1996
--	--------------------	------------	----------	-----	--------------------------

10. Reciclagem de aminoácidos*Enzima conjugadora de Ubiquitina e2 e1-like**Oreochromis niloticus* XP_003443199.1 4,30E-36 358BROWN *et al.*, 2008**11. Metabolismo do ácido retinóico***Retinol desidrogenase 3**Oreochromis niloticus* XP_003447377.1 2,33E-65 335

LIDÉN, ERIKSSON, 2006

12. Proteína de sinal*Proteína associada a senescência**Daphnia pulex* EFX62167.1 4,16E-54 401STRAUB *et al.*, 2004**13. Regulação hormonal***Proteína ligante 1 ao fator de crescimento Insulina-like**Oreochromis niloticus* XP_003438169.1 8,22E-77 445BO *et al.*, 2012**14. Ciclo celular***Ciclina g1**Oreochromis niloticus* XP_003455215.1 3,36E-16 453LANAHAN *et al.*, 2006**15. Coagulação sanguínea***Precursor da cadeia beta de Fibrinogênio**Oreochromis niloticus* XP_003455581.1 1,29E-93 526QU *et al.*, 2011**16. Função desconhecida***Proteína hipotética LOC100707306**Oreochromis niloticus* XP_003453180.1 9,42E-01 496

<i>Provável proteína de iniciação de replicação de plasmídio</i>	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	XP_731877.1	2,92E-39	535
<i>Proteína Upf0762 homóloga a c6orf58</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003440678.1	1,04E-110	517

4.7 Análise dos níveis de transcrição dos genes de interesse

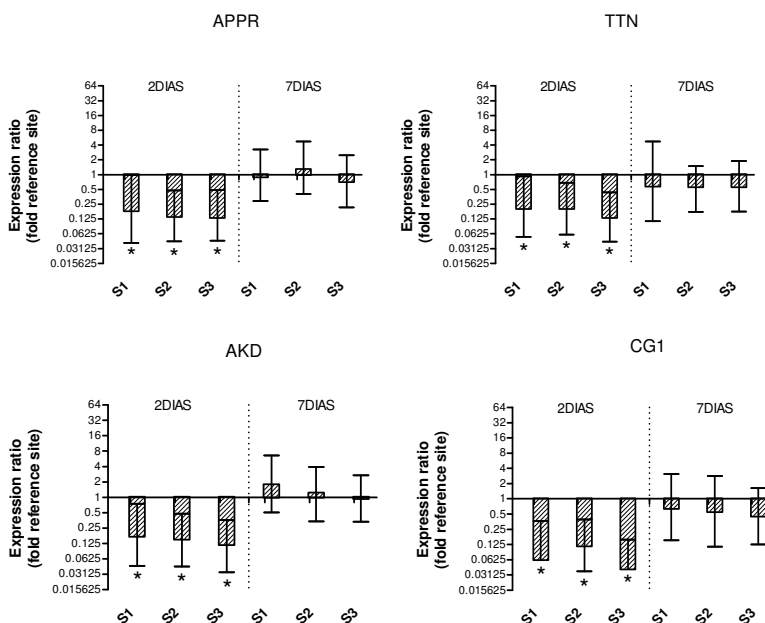
Inicialmente as técnicas de quantificação da transcrição dos genes foram padronizados juntamente com a curva padrão construída a partir de diluições seriadas de *pools* de cDNAs. As curvas padrão apresentaram valores de eficiência próximos a 100 % (**Tabela 10**) e amplificação de um único produto para cada gene testado.

Como gene normalizador, foi utilizado o gene codificante da proteína ribossomal 18s que apresentou uma maior homogeneidade, ou seja, não apresentou diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos e os tempos de exposição, viabilizando seu uso como gene constitutivo de referência (dados não mostrados).

Tabela 10. Eficiência de cada reação de PCR quantitativo em tempo real de cada gene em amostras de fígado de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas por dois e sete dias em áreas contaminadas da Bacia do Rio Cubatão do Norte

Gene	Sigla	Eficiência da reação (%)	
		2 dias de exposição	7 dias de exposição
<i>Apolipoproteína AI</i>	<i>APPR</i>	101	101
<i>Tetraspanina 3</i>	<i>TTN</i>	100	100
<i>Alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada E1</i>	<i>AKD</i>	103	103
<i>Ciclina-G1</i>	<i>CG1</i>	98	98
<i>Ceruloplasmina</i>	<i>CRP</i>	100	100
<i>Componente complemento c3</i>	<i>CC3</i>	105	99
<i>Alfa-2-macroglobulina</i>	<i>A2M</i>	97	97
<i>Coriogenina L</i>	<i>CNN</i>	100	97
<i>Ácido Graxo sintase</i>	<i>FAS</i>	105	105
<i>Retinol desidrogenase 3</i>	<i>RDY</i>	98	98
<i>Citocromo p450 2j6</i>	<i>P450</i>	97	96
<i>Fator complemento properdina</i>	<i>PPN</i>	99	98
<i>Aclimatação a temperatura alta</i>	<i>WTA</i>	102	101
<i>Fibrinogênio beta</i>	<i>FBG</i>	100	99
<i>Proteína Ribossomal 18s</i>	<i>S18</i>	96	96

Nas Figuras 7 e 8 estão representadas as transcrições relativas de cada um dos genes de Tilápia que foram mantidas em local contaminado em relação aos animais do local referência em cada tempo de exposição (dois e sete dias). Após dois dias de exposição dos peixes foi observada uma diminuição na transcrição dos genes hepáticos *APPR*, *TTN*, *AKD*, *CG1*, *CRP*, *A2M* e *CNN* mantidos em todos os locais experimentais. A transcrição do gene *CC3* também apresentou valores menores nos animais mantidos no local S3. Estes resultados demonstram a presença de falsos positivos pela técnica de SSH, uma vez que todos estes genes listados acima pertencem à lista dos genes identificados como ativados nos peixes expostos por 48 h no local S2 em relação ao grupo referência. Dentre estes genes, apenas *A2M* e *FAS* apresentaram uma diminuição de transcrição em peixes mantidos nos locais experimentais após sete dias de exposição.



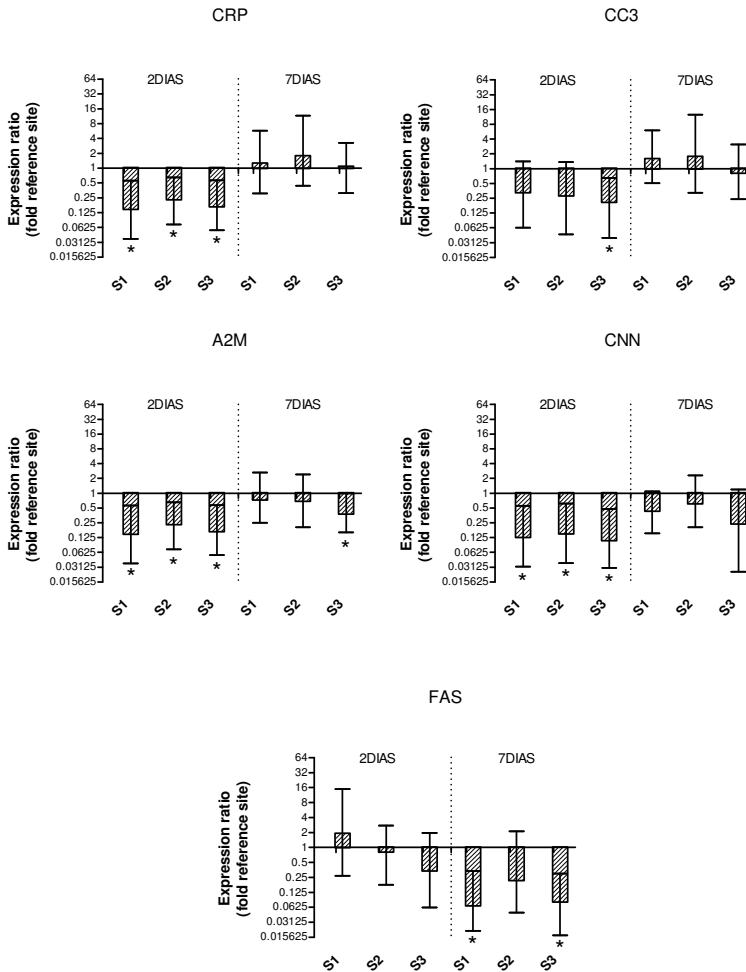


Figura 7. Níveis de transcrição gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real dos genes induzidos pela técnica de SSH. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle que é representado pelo eixo Y. Os dados estão mostrados na forma de média e intervalo de erro, calculados pelo programa REST2009. *APPR* - Apolipoproteína AI; *TTN* - Tetraspanina 3; *AKD* - Alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada E1; *CG1*- Ciclina-G1; *CRP*- Ceruloplasmina; *CC3*- Componente complemento; *A2M* - Alfa-2-macroglobulina; *CNN* - Coriogenina L; *FAS* - Ácido Graxo sintase.

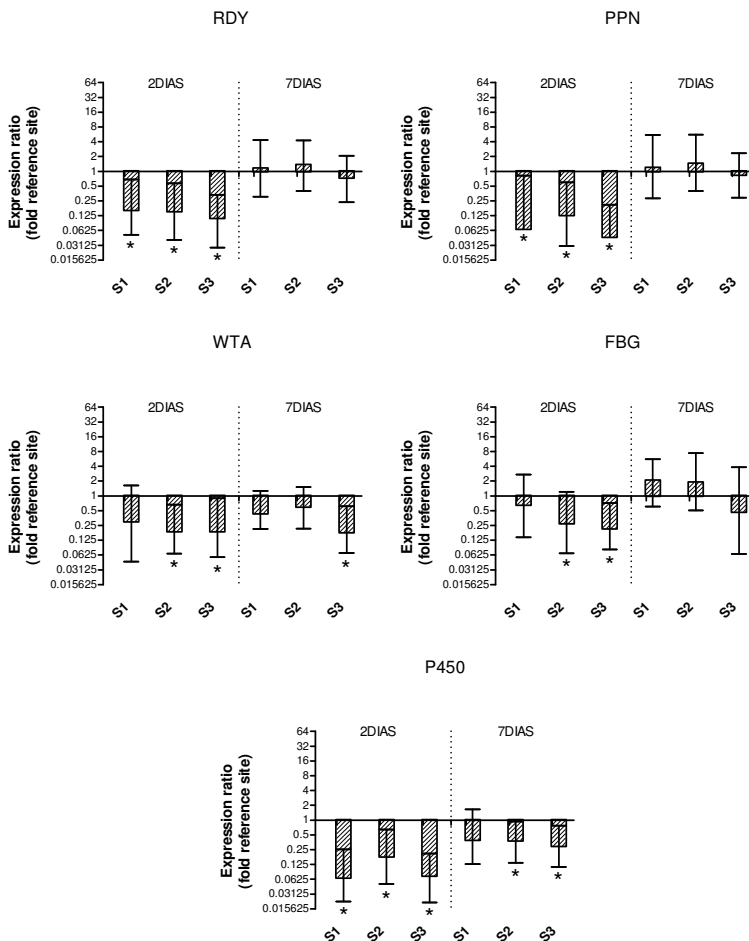


Figura 8. Níveis de transcrição gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real dos genes reprimidos pela técnica de SSH. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle que é representado pelo eixo Y. Os dados estão mostrados na forma de média e intervalo de erro, calculados pelo programa REST2009. *RDY* - *Retinol desidrogenase 3*; *PPN* - *Fator complemento properdina*; *P450* - *Citocromo p450 2j6*; *WTA* - *Aclimação a temperatura alta*; *FBG* - *Fibrinogênio beta*.

Todos os genes testados (*RDY*, *PPN*, *WTA*, *FBG*, *P450*) que foram identificados como reprimidos pela técnica de SSH nos peixes expostos no local S2 por 48 h apresentaram uma diminuição da transcrição nos animais dos diferentes locais de exposição, confirmando os resultados esperados. Entretanto, após sete dias de exposição, apenas os genes *WTA* e *P450* apresentaram níveis menores de transcrição nos peixes mantidos nos locais S2 e S3 de exposição.

5. DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros químicos e físicos da água

Nos ecossistemas aquáticos, o pH, a temperatura e os níveis de oxigênio dissolvido (OD) exercem um papel primordial no equilíbrio da manutenção na vida aquática. No entanto, esses parâmetros abióticos não apresentaram diferenças significativas nas amostras de água coletadas nos diferentes locais experimentais e no local Referência.

Considerando que a resolução CONAMA 410/2009 recomenda um valor mínimo de 6 mg/L de OD para águas de classe I e II, observaram-se os locais, ao longo dos dias de coleta, estes apresentaram valores recomendados, exceto no local S2 que apresentou uma média levemente inferior.

A temperatura da água nos diferentes locais experimentais não apresentou diferenças significativas, com uma média de 21,2 °C, de acordo com o esperado para a época do ano. A variação do pH afeta diretamente os corpos d'água e seus ecossistemas. Também pode ocorrer o aumento na solubilidade e concentração de algumas substâncias no meio, provocando maior biodisponibilidade e toxicidade (BARROS DE MACEDO, 2007). A resolução CONAMA 410/2009 estabelece para águas da classe I a II valores de pH entre 6,0 e 9,0 ideal para classes de águas destinadas à conservação das comunidades aquáticas. Desta forma o local S3 está abaixo do permitido, indicando uma situação de alerta para os seres vivos que habitam este ecossistema.

5.2 Parâmetros biológicos

Um ambiente aquático com qualidade da água é considerado o fator principal no controle do estado de saúde e doença em peixes, tanto cultivados, como silvestres. Alterações ambientais causadas por poluentes exercem influência no desenvolvimento dos animais, e no caso de peixes podem interferir na migração, incidência de doenças, comportamento, processos fisiológicos, ciclo de vida, efeitos genéticos, predação, reprodução, entre outros (DATTA, 1998?). O peso e o comprimento dos animais mantidos em exposição *in situ* no rio Cubatão por dois e sete dias não apresentaram alteração em relação aos animais

do local de referência (**Tabela 3**), o que era de certa forma esperado, considerando que os animais eram oriundos da mesma população e o tempo de exposição não foi suficiente para causar alterações nestes parâmetros biológicos.

5.3 Níveis de contaminantes

5.3.1 Hidrocarbonetos alifáticos

A poluição por hidrocarbonetos é de grande preocupação porque pode provocar a degradação dos ecossistemas causando problemas ambientais e sociais. Como tendem a ser acumulados no sedimento, estes compostos podem ser bioacumulados por organismos com hábitos bentônicos (COMMENDATORE *et al.*, 2012).

O índice de preferência de carbono (CPI) próximo a 1, mostra predominância petrogênica, e enquanto que valores > 5 e 7 apresentam uma contribuição biogênica predominante (BOULOUBASSI *et al.*, 1997). Os níveis de hidrocarbonetos alifáticos variaram de uma concentração entre 4 e 10,9 (4,0–S2; 7,5–REF; 8,8–S1; 10,9–S3), sugerindo uma leve contaminação petrogênica no local S2. No geral, os resultados do presente trabalho indicam que em todos os locais há uma combinação de fontes de matéria orgânica no sedimento. O local S2 está localizado próximo ao cartódromo de Joinville, que pode estar associado aos níveis mais próximos de contaminação por derivados de petróleo.

Por outro lado, as maiores concentrações de hidrocarbonetos alifáticos totais nas amostras de *Oreochromis niloticus* foram observadas nos animais da estação S1 ($139 \mu\text{g.g}^{-1}$) e os menores valores foram observados nos animais da estação S2 ($2,35 \mu\text{g.g}^{-1}$). A distribuição dos n-alcenos (**ANEXO 4**) mostra que todas as amostras apresentaram somente compostos naturais tanto provenientes principalmente de ceras cuticulares de plantas superiores (n-alcenos ímpares com cadeia maior que $n\text{-C}_{21}$).

5.3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos derivados de ações antrópicas, por exemplo, processos de combustão incompleta de materiais orgânicos, combustíveis; e de fontes naturais, como incêndios florestais ou atividade vulcânica (GHISELLI & JARDIM, 2007). Estes compostos na natureza são responsáveis por uma ampla variedade de respostas biológicas nos organismos em função da sua concentração, persistência e toxicidade (DEVIER *et al.*, 2012).

As amostras de sedimentos de Joinville apresentaram valores de 11,6 ng.g⁻¹ (REF), 38,6 ng.g⁻¹ (S1), 1179 ng.g⁻¹ (S2) e 857 ng.g⁻¹ (S3) sendo que os maiores níveis foram observados no local S2, seguido do local S3 (**ANEXO 3**). Notar *et al.* (2001) sugerem que um sedimento é considerado contaminado quando a soma de HPAs atinge valores superiores a 500 ng.g⁻¹. Segundo estes valores, os locais S2 e S1 estão com níveis superiores, sendo, portanto considerados como contaminados por HPAs. Levando em conta que o sedimento representa um integrador dos níveis de contaminantes ao longo do tempo, a identificação desses compostos de origem antropogênica mostra o potencial impacto ao meio e, conseqüentemente, um alerta à sociedade.

Semelhante aos hidrocarbonetos alifáticos, as maiores concentrações de HPAs totais nas amostras de fígado da tilápia foram quantificadas no grupo mantido no local S1 (348 ng.g⁻¹), seguida das amostras de S2 (309 ng.g⁻¹), S3 (172 ng.g⁻¹) e referência (74,3 ng.g⁻¹).

5.3.3 Alquilbenzeno lineares (LAB)

Alquilbenzenos lineares (LAB) são parceiros silenciosos no cotidiano do homem, encontrados como aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, cosméticos, produtos de limpeza e indústria do petróleo. O uso indiscriminado desses detergentes sintéticos cria lentamente efeitos acumulativos prejudiciais tanto para os ecossistemas, como para o homem (ASOK & JISHA, 2012). Os maiores níveis de LABs foram detectados no sedimento do local S2, o que indica a possível contaminação por resíduos de esgoto doméstico neste local. Martins *et al.* (2010) encontraram valores semelhantes aos das amostras de sedimento de Joinville, mas já foram encontrados valores de até 60000 ng.g⁻¹ de LABs no sedimentos em diferentes estudos ao redor do mundo

(LUO *et al.*, 2008). As concentrações deste estudo foram mais baixas comparadas às encontradas por Isobe *et al.* (2004), nas quais os maiores valores foram entre 4000 a 13000 ng.g⁻¹ LABs totais no sul e sudeste da Ásia, enquanto os rios que deságuam na Indonésia mostraram valores entre 3 a 42000 ng.g⁻¹ LABs totais.

A concentração de LABs Totais em lipídios nas amostras de fígado da tilápia *Oreochromis niloticus* variou de 2,47 a 4,89 µg.g⁻¹. A concentração mais alta encontrada no fígado foi na amostra do local S2 (4,89 µg.g⁻¹), seguida das amostras de S1 (3,43 µg.g⁻¹), S3 (2,67 µg.g⁻¹) e referência (2,47 µg.g⁻¹). O principal local de depósito de LABs é o tecido adiposo, no entanto no presente estudo foi analisado o fígado por ser o principal órgão responsável pela biotransformação de xenobióticos (MARTINS, 2007).

5.3.4 Pesticidas Organoclorados (HCB)

Atualmente muitos pesticidas organoclorados são proibidos em vários países, inclusive no Brasil esta proibição existe desde 1985 (MIRANDA *et al.*, 2008). Apesar disso, ainda são encontrados no ambiente, liberados como um subproduto de vários processos industriais. O uso destes poluentes orgânicos persistentes resultam na contaminação de ambientes aquáticos e da acumulação destes tóxicos em organismos através de diferentes mecanismos: bioconcentração pela captação direta de água através de brânquias e da pele, a ingestão de partículas, ou através da biomagnificação pelo consumo de alimentos contaminados (MIRANDA *et al.*, 2008). A concentração de DDTs totais encontrada nas amostras de sedimento de Joinville variou de 0,15 a 2,25 ng/g. A concentração mais alta foi encontrada na amostra da estação S2 (2,25 ng.g⁻¹) seguida pela amostra do grupo REF (2,07 ng.g⁻¹). Segundo a Portaria nº 024/79 que enquadra os cursos d'água no Estado (BRASIL, 1979) classifica o rio Cubatão como classe 1, sugerindo uma máxima concentração de DDT de 50 ng.l⁻¹. Portanto, quanto a este parâmetro, este rio atende as condições requeridas. Apesar de ser níveis baixos, interessante constatar a presença destes contaminantes ainda no ambiente, mesmo depois de vários anos de sua proibição, o que evidencia sua persistência no meio.

5.3.5 Esteróis

A detecção da poluição de águas residuais no ambiente é de considerável importância para a estética, saúde humana e ambiental. Indicadores microbiológicos, como coliformes fecais, são rotineiramente empregados na avaliação da qualidade da água, mas sua ausência não garante inexistência de organismos prejudiciais ao ambiente (BARTLETT, 1987; MCCALLEY *et al.*, 1981). Coprostanol é o principal esterol fecal do ser humano, compreendendo 40 a 60% do total de esteróis excretados, o qual torna-se um indicador para confirmar contaminação por esgoto (BACHTIAR, RADJASA, SABDONO, 2004). A avaliação da contribuição de esgotos para os sedimentos foi realizada utilizando a concentração de coprostanol. Valores maiores que 0,10 $\mu\text{g.g}^{-1}$ indicam que o ambiente está contaminado por esgotos e acima de 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a contaminação é considerada alta. As concentrações de coprostanol no sedimento variaram de 0,15 a 9,12 $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco. A maior foi encontrada na amostra do ponto S2, seguido do S3, REF e S1 (**Figura 6**). Associando os dados de LABs totais com os de coprostanol, percebe-se que o local S2 recebe um aporte significativo de esgoto doméstico. Apesar das concentrações serem relativamente baixas nos demais locais, é possível sugerir que exista um pequeno aporte de esgoto nestes ambientes.

5.3.6 Análise de metais

As concentrações de metais detectadas nos músculos dos peixes mantidos nos diferentes locais de estudo foram consideradas baixas para cádmio, níquel, chumbo, arsênio, mercúrio e zinco, estando de acordo com a legislação brasileira Portaria n.685 (BRASIL, 1998). Já o cromo apresentou valores consideravelmente próximos ou superiores (0,14 a 0,26 mg.Kg^{-1}) aos limites máximos permitidos pela legislação que estabelece os níveis para o consumo de alimentos (0,1 mg.kg^{-1}) (BRASIL, 1965).

O manganês e o ferro não possuem valores estabelecidos para consumo no Brasil, mas a *World Health Organization* (WHO) (1993) propõe 0,8 mg.Kg^{-1} de ferro diário. A maior concentração de ferro foi 29,68 mg.Kg^{-1} detectada no músculo dos peixes mantidos no local REF e a menor (25,45 mg.Kg^{-1}) foi quantificada nos animais da estação S3.

Possivelmente esta alta concentração de ferro nos peixes do local referência esteja relacionada ao enriquecimento nutricional dos animais na estação de piscicultura.

5.4 Respostas moleculares

A bacia do rio Cubatão do Norte, local do estudo, sofre influência de diferentes contaminantes, oriundos do esgoto doméstico, industrial e resíduos das atividades agrícolas e agropecuária (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Nesses efluentes existem misturas complexas de contaminantes que provocam uma resposta a nível transcricional do animal frente a essas fontes poluidoras. A exposição destes poluentes causou a indução de diferentes classes de genes na Tilápia do Nilo.

A utilização da técnica do SSH associada a técnicas de clonagem e sequenciamento possibilitou a identificação de genes diferencialmente transcritos nas tilápias expostas *in situ* em dois locais desta bacia hidrográfica (**Tabelas 8 e 9**). Os animais mantidos por 48 h no local S2 apresentaram genes induzidos com funções biológicas associadas ao sistema imunológico, cadeia respiratória, proteínas ribossomais, metabolismo de lipídios, metabolismo de lipoproteínas, ciclo celular, sinalização, mitocondriais, reparo de DNA, regulação de ácidos nucleicos, estrutura celular, inibidor de protease, metabolismo de metais, armazenamento de oxigênio muscular, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, ativador de Fase II, fototransdução, reprodução e alguns não identificados (**Tabela 8**).

Os genes identificados como reprimidos nestes peixes apresentaram as seguintes funções biológicas: sistema imunológico, cadeia respiratória, proteínas ribossomais, regulação de ácidos nucleicos, reparo de DNA, metabolismo de lipídios, transporte celular, osmoregulação, fase I de biotransformação, reciclagem de aminoácidos, metabolismo do ácido retinóico, proteína de sinalização, regulação hormonal, ciclo celular, coagulação sanguínea e alguns com função desconhecida (**Tabela 9**).

Pela sua importância biológica foram escolhidos alguns genes pertencentes à lista dos genes induzidos e reprimidos para a realização dos experimentos de validação por PCR quantitativo em tempo real. Entre os genes testados como induzidos estavam *apolipoproteína AI (APPR)*, *tetraspanina 3 (TTN)*, *alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada E1 (AKD)*, *ciclina-G1 (CG1)*, *ceruloplasmina (CRP)*,

componente complemento C3 (CC3), alfa-2-macroglobulina (A2M), coriogenina L (CNN) e ácido graxo sintase (FAS).

Os resultados do PCR quantitativo em tempo real dos genes escolhidos para validação que foram identificados como induzidos mostraram que todos os genes eram falsos positivos pela técnica de SSH (**Figura 7**). Foi observada uma diminuição na taxa de transcrição dos genes *APPR*, *TTN*, *AKD*, *CG1*, *CRP*, *A2M* e *CNN* no fígado dos animais expostos por 48 h em todos os locais de exposição, quando comparados com os animais referência. O gene *CC3* apresentou uma diminuição nos animais expostos ao local S3, enquanto que o gene *FAS* não apresentou alterações em sua transcrição nos animais dos diferentes locais. Após 7 dias de exposição este gene também apresentou uma diminuição na transcrição nos locais S1 e S3.

Importante mencionar que os genes *CC3*, *APPR* e *CG1* foram identificados nas duas listas de genes, induzidos e reprimidos, mas através dos experimentos de validação, concluímos que os mesmos estavam de fato reprimidos nos animais mantidos nos locais de exposição.

Por outro lado, todos os genes escolhidos na lista daqueles que estavam identificados como reprimidos foram validados como reprimidos nos animais expostos por 48 h nos diferentes locais de estudo, a saber: *retinol desidrogenase 3 (RDN)*, *fator complemento properdina (PPN)*, *citocromo p450 2j6 (P450)*, *aclimação a temperatura quente (WTA)*, *fibrinogênio beta (FBG)*. Após 7 dias de exposição o gene *P450* ainda estava com transcrição diminuída nos peixes dos locais S2 e S3.

Apesar da técnica de SSH ter se mostrado com problemas de identificação de falsos positivos na lista dos genes ativados, serviu para um maior conhecimento de sequências gênicas de tilápias. Outros estudos também identificaram falsos positivos como Mattos (2010), Pinto *et al.* (2006, b) e Reyes, Salazar e Granja (2007). Pinto *et al.* (2006, b) em seu estudo na identificação de genes responsivos ao estrogênio em *Sparus auratus* usando a técnica de SSH, identificaram falsos positivos neste procedimento.

De uma maneira geral todos os genes escolhidos para validação apresentaram uma diminuição em sua transcrição nos animais mantidos nos locais experimentais. Este resultado poderia estar associado ao transporte e acondicionamento dos peixes nos rios em condições de estresse ou pela própria contaminação dos locais, conforme mostrado pelos resultados de análises químicas. Importante mencionar que os peixes que permaneceram no local REF também foram acondicionados

em gaiolas, o que eliminaria o estresse de condicionamento com fator de desencadeamento destas respostas, uma vez que todos os grupos estariam nas mesmas condições.

Nesse trabalho foi observado um número significativo de genes que codificam proteínas do sistema imune inato com alteração em sua transcrição. Estes genes podem ser alterados por diferentes estressores ambientais. Segundo Calduch-Giner e colaboradores (2010) o estresse modula as funções do sistema imunológico dos peixes, embora o efeito dependa da intensidade do estressor. O estresse a curto prazo, pode aumentar ambos os componentes celulares e humorais das defesas inatas de peixe. Miranda *et al.* (2008), avaliaram os impactos de pesticidas clorados e PCBs em traíras (*Hoplias malabaricus*), onde foi caracterizado um distúrbio no sistema imune desses animais causado pela toxicidade desses poluentes. Assim como Schwacke *et al.* (2012) observaram uma diminuição dos índices da imunidade inata de *Tursiops truncatus* que se encontram em uma região contaminada por PCBs dos Estados Unidos (SCHWACKE *et al.*, 2012). Rougier *et al.*, (1994) em estudos com pequenas concentrações de cobre, entre 0,3 e 0,5 m/L durante sete dias, observaram uma imunossupressão da atividade de células NK (do inglês Natural Killer Cell) em Zebrafish (*Danio Rerio*) (ROUGIER *et al.*, 1994).

Vários estudos tem demonstrado que diferentes poluentes causam imunossupressão em peixes, tais como pesticidas, herbicidas, organoclorados, organofostorados, metais pesados, PCBs e conjuntos de xenobióticos. Entretanto a integridade do sistema imunológico é fundamental para uma defesa normal contra patógenos em peixe (parasitas, bactérias, e vírus) (DUNIER, 2009).

Funções interessantes têm sido atribuídas às principais apolipoproteínas, apoA-I e A-II. Entre elas, as envolvidas nos mecanismos de proteção, como a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana de lipoproteína de alta densidade (HDL). Apolipoproteína AI é o constituinte principal da HDL, que por sua vez corresponde à proteína mais abundante no plasma de peixes teleosteos, relevante para tecidos como a pele, atuando como uma barreira de defesa primária (CONCHA *et al.*, 2003).

A família de proteínas do sistema complemento é de grande importância para o sistema imune inato, atuando como uma barreira por sua capacidade de matar agentes patogênicos pela criação de poros em membranas de superfície. Os peixes exibem uma grande diversidade de componentes complemento, em especial o C3, que pode ter, pelo menos, cinco isoformas em uma única espécie. Acredita-se que muitos

componentes possam ser um produto de gene duplicado, derivados de um ancestral comum, provavelmente, o inibidor de proteinase do plasma alfa-2macroglobulina (CLAIRE, HOLLAND, LAMBRIS, 2002; LANGE *et al.*, 2005). Alfa-2macroglobulina atua mantendo a homeostase dos fluidos corporais, que tem uma elevada especificidade para o encapsulamento da inibição física das proteases (URIBE *et al.*, 2011).

Properdina é uma proteína envolvida na ativação da via complemento, ao ligar-se no complemento C3, considerado uma proteína importante na intervenção desta via. Mas Gauvreau *et al.* (2012), demonstraram que properdina, além de ter seu efeito sobre o sistema imunológico, desempenha um papel potencial no metabolismo energético e em especial sobre o metabolismo dos lípidos, sugerindo que o efeito da properdina pode ser regulada pela absorção de ácidos graxos.

A proteína de aclimação em altas temperaturas (*Warm temperature acclimation*) está associada à adaptação do animal a variações de temperatura. Olsvik *et al.* (2011) identificaram um gene homólogo à proteína de aclimação em altas temperaturas em uma biblioteca subtrativa em peixes tratados com óleo bruto e observou uma diminuição na expressão desta proteína nos animais expostos sem estar relacionada a alteração de temperatura. Esta resposta é interessante porque apesar de não ter sido controlada a temperatura no presente trabalho, esta se manteve constante e portanto, este mecanismo de resposta pode estar envolvido com outros estressores ambientais.

Outro gene reprimido envolvido no sistema imune é a tetraspanina a qual está relacionada ao contato com parasitas. Benjamin Morga *et al.* (2010), encontraram uma repressão desta proteína em hemócitos de *Ostrea edulis* infectadas com um parasita protista vivo. Além da relação acima citada, as tetraspaninas estão envolvidas em diversos processos biológicos, tais como adesão celular, migração, diferenciação de células de fusão, coestimulação, transdução de sinal. No entanto, a função bioquímica da proteína tetraspanina está relacionada como um facilitador molecular por associação e orquestra uma série de outras proteínas, ao qual é especializado em microdomínios de membrana envolvidos na comunicação celular (MORIBE *et al.*, 2012).

Dois genes do metabolismo de lipídios tiveram sua expressão reprimida, citocromo p450 2j6 e ácido graxo sintase, um faz parte do metabolismo do ácido araquidônico, precursor de ácidos graxos essenciais (WANG *et al.*, 2007), e o outro está envolvido na produção de ácido graxo de cadeia longa (BERG *et al.*, 2002). A consequente

alteração na transcrição desses genes pode estar relacionada à diminuição do fornecimento de ácidos graxos essenciais pela alimentação, e conseqüentemente na produção de mediadores essenciais como as prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico, que atua nas defesas celulares, interagindo em processos de inflamação (FREEDMAN *et al.*, 2007).

Um dos genes que codificam proteínas envolvidas no ciclo celular também foi selecionado para a validação, a *ciclina G1 (CG1)*, que apresentou uma diminuição na transcrição nos peixes mantidos por dois dias de exposição em todos os locais estudados. CG1 faz parte do ciclo celular de eucariotos em conjunto com a proteína ciclina dependente de quinase (CDKs) e podem ser induzidas, em resposta ao dano no DNA (SANDEN *et al.*, 2012; KIMURA *et al.*, 2001). A toxicidade de poluentes pode desregular o ciclo celular, e conseqüentemente alterar a expressão de genes associados (SANTUCCI *et al.*, 2003). Santucci *et al.* (2003) encontraram em ratos expostos a produtos químicos uma desregulação de sinais envolvidos na progressão do ciclo celular, em particular, os inibidores de complexos de ciclina/ciclina dependente de quinase que foram significativamente modulados afetando a expressão de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular.

Fibrinogênio não é importante apenas para as funções pró-coagulante, mas também para atividades pró-inflamatórias. Estes eventos são regulados, em grande medida pelo processo de formação de fibrina e por interações entre os sítios específicos de fibrinogênio ou fibrina e moléculas extrínsecas. Nossos resultados indicam a repressão da atividade deste gene, que em níveis baixos pode produzir hemorragias leves a graves (MOSESSON, SIEBENLIST, MEH, 2001; FORT *et al.*, 2010). Possivelmente este resultado esteja associado ao fato de que na hora da coleta, alguns peixes apresentavam manchas avermelhadas, principalmente no ventre, sugerindo a existência de hemorragias.

O gene *alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada E1 (AKD)* codifica uma proteína envolvida no catabolismo de proteínas. Os aminoácidos são nutrientes essenciais para sobrevivência, crescimento e funcionamento normal da célula (SUN *et al.*, 2011). AKD é um gene envolvido com a falta de alimento, o que não justifica a repressão deste, pois em jejum prolongado o organismo começa a degradar as proteínas para a produção de energia, assim como já mencionado este foi considerado um gene falso positivo pela a técnica de SSH.

Murata *et al.* (1995) realizaram a clonagem e análise de cDNA para o gene da *coriogenina* (*CNN*) e confirmaram que a transcrição deste gene ocorre exclusivamente no fígado, e não no ovário, apesar da *CNN* estar descrita como uma proteína da camada interna do ovo de vários animais. A expressão desta proteína foi proposta como biomarcadora sensível à exposição a compostos estrogênicos. Yu *et al.* (2006) expuseram peixes a estradiol na água em concentrações relevantes para o ambiente que resultou na indução dos genes *coriogenina L* e *H* no fígado, e com maior sensibilidade em machos do que nas fêmeas. Neste trabalho, foi observada uma diminuição da transcrição do gene da *CNN* após dois dias de exposição, o que sugere a inexistência de compostos estrogênicos nos locais avaliados durante o estudo.

A ceruloplasmina (*CRP*) é uma proteína (alfa-2-globulina) produzida no fígado que carrega mais de 95% do cobre plasmático, considerada de fase aguda em processos inflamatórios (HELLMAN & GITLIN, 2002). Por ser a principal transportadora de cobre é considerada um antioxidante plasmático importante, pois estaria prevenindo a ação catalítica deste íon na produção de EROs (espécies reativas de oxigênio). As causas na repressão na transcrição do gene da *CRP* não estão claras, mas uma diminuição de *CRP* poderia acarretar em um potencial aumento na produção de EROs pela exposição a xenobióticos, contribuindo para o estabelecimento de um estresse oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante plasmática (AAZZA; LYOUSSEI; MIGUEL, 2011).

As fontes dietéticas de retinol são as proformas da vitamina A. Deste modo, a biossíntese de formas ativas de retinoides é de crucial importância para muitos processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, reprodução, crescimento pós-natal, diferenciação e manutenção de vários epitélios, as respostas imunes e visão (LIDÉN & RIKSSON, 2006). A conversão de retinol na sua forma ativa ao ácido retinoico é realizada através de um processo de conversão de retinol em retinal, catalisada por retinol desidrogenases (*RDY*). A conversão de retinal para o ácido retinóico, é realizada por retinaldeído desidrogenase (NADAULD *et al.*, 2005). A diminuição da transcrição da *RDY* poderia estar implicando na menor taxa de biossíntese do ácido retinoico, processo este que estaria contribuindo para a diminuição das defesas do sistema imunológico dos animais expostos.

De modo geral, todos os genes avaliados por PCR quantitativo apresentaram uma diminuição na taxa de transcrição após dois dias de

exposição. Já em sete dias de exposição somente alguns genes tiveram diminuição na taxa de transcrição (A2M, FAS, WTA, P450) em alguns locais de exposição. Estes resultados podem estar relacionados, a ativação desses genes a nível traducional considerando que uma porcentagem dos genes induzidos encontrados com a SSH codificam proteínas ribossomais que fazem parte da maquinaria celular de tradução. Outra questão que pode estar relacionada é a ativação de mecanismos de adaptação às condições ambientais. Estas respostas adaptativas são essenciais para restaurar o equilíbrio do organismo. Envolvendo ajustes funcionais na utilização das reservas energéticas, mobilizando estes nutrientes, bem como, o oxigênio para órgãos priorizados. Esta falta de energia redireciona o metabolismo celular para a ativação da proteólise e oxidação lipídica. Paralelamente, ocorre inibição de funções digestivas, reprodutora, imune e de crescimento (CHROUSOS *et al.*,1995; CSERMELY, 1998).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- As análises químicas do sedimento dos locais de exposição mostraram um maior grau de contaminação por esgoto doméstico e/ou poluentes químicos orgânicos, no local S2, seguindo pelo ponto S3, S1 e REF;

- Os genes encontrados na biblioteca subtrativa obtida por SSH, nos mostra um panorama da resposta da Tilápia do Nilo, frente aos contaminantes encontrados nos três locais de exposição da Bacia, com a identificação de vários genes envolvidos em diversas funções biológicas;

- Os estudos de validação mostraram que a técnica de SSH utilizada para a identificação dos genes induzidos não funcionou como esperado, pois todos os genes testados foram falso positivos. Por outro lado, os experimentos de SSH que identificaram os genes reprimidos foram validados pelo PCR quantitativo em tempo real;

- Os testes de validação confirmaram que os animais expostos por dois dias nos locais experimentais apresentaram uma supressão na transcrição de genes que codificam proteínas do sistema imune, do sistema de coagulação, do metabolismo lipídico, do metabolismo de aminoácidos, ovogênese, transporte de metais e ciclo celular;

- Após sete dias de exposição praticamente todos os genes testados não apresentaram alterações em sua transcrição, o que sugere a existência de mecanismos adaptativos às condições ambientais ou resposta à nível traducional;

-A bioacumulação de poluentes orgânicos persistentes em peixes da expostos a Bacia do Rio Cubatão do Norte mostra que os ambientes de água doce ao redor desta região estão expostos a impactos por poluentes persistentes de diversas fontes, constituindo um fator de risco para os organismos aquáticos e possivelmente para à população humana;

-Estas informações poderão auxiliar na compreensão, de uma forma integrada, dos efeitos biológicos a nível transcricional causados pelos contaminantes presentes no ambiente visando auxiliar futuros programas de avaliação e monitoramento em recursos hídricos com suspeita de contaminação ambiental;

REFERÊNCIAS

AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, n.16, p.7672-7690, 2011.

ABEBE, T.; SKADSEN, R. W.; KAEPLER, H. F. Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemma and palea. **Crop Science**, n.44, p.942-950, 2004.

AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, 2003.

ALVES, S. R. C. **Respostas bioquímicas em Tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC**. Dissertação mestrado, PPG Biotecnologia, UFSC. Florianópolis, SC. 2003.

ARIAS, A. R. L., *et al.* Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. **Ciência & Saúde Coletiva**, n.12, v.1, p.61-72, 2007.

ASOK, A. K.; JISHA M. S. Biodegradation of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (Las) by autochthonous *Pseudomonas* sp. **Water Air Soil Pollut**, n.223, p.5039-5048, 2012.

AUSLANDER, M. *et al.* Pollution-affected fish hepatic transcriptome and its expression patterns on exposure to cadmium. **Mar Biotechnol**, n.10, p.250-261, 2008.

BACHTIAR, T.; RADJASA, O. K.; SABDONO, A. Natural biodegradation of coprostanol in an experimental system of three environmental conditions of jakarta waters, Indonesia. **Journal of Coastal Development**, v.8, n.1, p.17-25, oct. 2004.

BARROS DE MACEDO, J. A. **Águas & águas**. Aquicultura, ed.3, 2007.

BARTLETT, P. D. Degradation of coprostanol in an experimental system. **Mar. Pollut. Bull.**, n.18, p.27-29, 1987.

BENDATI, M. M. A. **Avaliação das concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu e Zn em amostras de água, sedimento e *Neocorbicula limosa* (Maton, 1811) (Mollusca: Bivalvia) no Guaíba, RS.** Dissertação. Pós-graduação em Ecologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

BERG, J. M. *et al.* Fatty acids are synthesized and degraded by different pathways. **Biochemistry**, ed.4, seq. 22.4, 2002.

BO, J. *et al.* Identification of differentially expressed genes and quantitative expression of complement genes in the liver of marine medaka *Oryzias melastigma* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.191–200, 2012.

BOLOGNESI, C. *et al.* Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. **Mutation Research**, n.552, p. 153-162. 2004.

BOSCOLO, W.R., *et al.* Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Revista brasileira de zootecnia**, v.30, n.5, p.1391-1396, 2001.

BOULOUBASSI, I. *et al.* Carbon sources and cycle in the western Mediterranean-the use of molecular markers to determine the origin of organic matter. **Deep-Sea Research II**, v.44, p.71-799, 1997.

BOUTETA, I.; LONG KY, C. L.; BONHOMME, F. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost. **Dicentrarchus labrax**. **Gene**, n.379, p.40–50, 2006.

BRASIL. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Dispõe sobre normas regulamentadoras do emprego de aditivos para alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, abr. 1965.

BRASIL. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº685, de 27 de agosto de 1998. Fixa limites máximos de

tolerância de contaminantes químicos em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, set. 1998.

BRASIL. Enquadra os cursos d'água do Estado de Santa Catarina. Portaria nº 024/79. Lei nº 5.516, fev. 1979.

BROWN, M. M. *et al.* Construction of subtracted EST and normalised cDNA libraries from liver of chemical-exposed three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) containing pollutant-responsive genes as a resource for transcriptome analysis. **Marine Environmental Research**, n.66, p.127–130, 2008.

BRULLE, F., *et al.* Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, n.32, p.1441–1453, 2008.

CANABARRO, L.; TOLEDO, M. T. A study of the oxidative stress mechanisms in liver of *Oreochromis niloticus* taken from artificial environments in the area of Sorocaba. **Revista eletrônica de biologia**. Sorocaba, SP, v.1, n.4, p. 31-57, 2010.

CALDUCH-GINER, J. A. *et al.* Research article Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), **BMC Genomics**, v.193, n.11, p.1471-2164, 2010.

CHANG, M. X. *et al.* Identification of immune genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella* in response to infection of the parasitic copepod *Sinergasilus major*. **Parasitol Res.**, n.96, p.224–229, 2005.

CHEN, S. *et al.* Identification of a puromycin-sensitive aminopeptidase from zebrafish (*Danio rerio*) **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.10–17, 2011.

CHROUSOS, G. P *et al.* Stress. Basic mechanisms and clinical implications. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 771, 1995.

CLAIRE, M.; HOLLAND, H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, n.12, p.399–420, 2002.

COLLIN, H. *et al.* Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. **The Journal of Experimental Biology**, n.213, p.4010-4017, 2010.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, n.336, p.69-77, 1995.

COMMENDATORE, M. G. *et al.* Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). **Marine Environmental Research**, n.74, p.20-31, 2012.

CONAMA 410/2009. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Altera o art. 44 da Resolução nº 357/2005 e o art. 3º da Resolução nº 397/2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 18/02/13.

CONAMA 430/2011. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Complementa e altera a Resolução nº 357/2005. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 05/03/13.

CONCHA, M. I. *et al.* Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defence in the carp skin. **Fish & Shellfish Immunology**, n.14, p.259–273, 2003.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n.34, p.246-255, 1999.

CRUZ-GARCIA, L. *et al.* Regulation of LXR by fatty acids, insulin, growth hormone and tumor necrosis factor- α in rainbow trout myocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.125–136, 2011.

CSERMELY, P. Stress of life from molecules to man. **Annals of the New York academy of sciences**, v.851, 1998.

DATTA, S. **Effects of aquatic pollution on fish & fisheries**, 1998?. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/7076320/EFFECT-OF-AQATIC-POLLUTION-ON-FISH-FISHERIES>. Acessado em: 02 de dezembro de 2012.

DÉVIER, M. H. *et al.* Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). **Environ Sci Pollut Res**, 2012.

DIOS, L. S. *et al.* Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. **Molecular Immunology**, n.44, p.2195–2204, 2007.

DUNIER, M. Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. **Italian Journal of Zoology**, n.63, p.303-309, 2009.

FENG, C. Y. *et al.* Identification and analysis of differentially expressed genes in immune tissues of Atlantic cod stimulated with formalin-killed, atypical *Aeromonas salmonicida*. **Physiol Genomics**, n.37, p.149–163, 2009.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v.3, n.205, p.223-240, 2004.

FREEDMAN, R. S. *et al.* Comparative analysis of peritoneum and tumor eicosanoids and pathways in advanced ovarian cancer. **Human Cancer Biology**, v.19, n.13, oct. 2007.

FRENZILLI, G., *et al.* The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, n.681, p.80–92, 2009.

FITZHUGH, T. W.; RICHTER, B. D. Quentin urban thirst: growing cities and their impacts on freshwater ecosystems. **BioScience**, v. 54, p. 741-754, 2004.

FORT, A. *et al.* Regulation of fibrinogen production by microRNAs. **American Society of Hematology**, v.116, n.14, oct. 2010.

GALLOWAY, T. S., *et al.* Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. **Marine Environmental Research**, n.58, p.233–237, 2004.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova**, v.30, n.3, p.695-706, 2007.

GONZALEZ-OREJA, J. A.; SAIZ-SALINAS J. I. Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. **Marine Pollution Bulletin**, n.36, p.868–875, 1998.

GAUVREAU, D. *et al.* A new effector of lipid metabolism: Complement factor properdin. **Molecular Immunology**, n.51, p.73–81, 2012.

GRIMALT, J.O.; FERNANDEZ, P., BAYONA, J. M., ALBAIGES, J. Assessment of fecal sterols and ketones as indicator of urban sewage inputs to coastal waters. **Environmental Science & Technology**, n.24, p.357-363, 1990.

HAITINA, T. *et al.* Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. **Genomics**, n.88, p.779–790, 2006.

HELLMAN, N. E.; GITLIN J. D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, n.22, p.439–58, 2002.

ISOBE, K. O. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Research**, n.38, p.2449–2459, 2004.

KAWAKAMI, S. K., MONTONE, R. C. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal steroids in marine sediments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.2, p.226-232, 2002.

KIMURA, S. H. *et al.* Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. **Oncogene**, n.20, p.3290 – 3300, 2001.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. FATMA, p.14-27, 2004.

KOSKINEN, H. *et al.* Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.320, p.745–753, 2004.

KOTURBASH, I.; BELAND, F. A.; POGRIBNY, I. P. Role of microRNAs in the regulation of drug metabolizing and transporting genes and the response to environmental toxicants. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v.5, n.8, p.597-606, 2012.

LANAHAN, A. A. *et al.* Synectin-dependent gene expression in endothelial cells. **Physiological Genomics**, n.27, p.380–390, 2006.

LANGE, S. *et al.* The ontogenic transcription of complement component C3 and Apolipoprotein A-I tRNA in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*)—a role in development and homeostasis? **Developmental and Comparative Immunology**, n.29, p. 1065–1077, 2005.

LENZNER, S. *et al.* Global gene expression analysis in a mouse model for norrie disease: Late involvement of photoreceptor cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.43, n.9, sept. 2002.

LIANG, C.; TALL, A. R. Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v.276, n.52, p.49066–49076, dez. 2001.

LIDÉN, M.; ERIKSSON, U. Understanding retinol metabolism: Structure and function of retinol dehydrogenases. **The journal of biological chemistry**, v.281, n.19, p.13001–13004, may 2006.

- LIN, S. W. *et al.* Human γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. **GENOMICS**, n.34, p.376–380, 1996.
- LUO, X. L. *et al.* Tracing sewage pollution in the Pearl River Delta and its adjacent coastal area of South China Sea using linear alkylbenzenes (LABs). **Marine Pollution Bulletin**, n. 56, p. 158-162, 2008.
- MCCALLEY, D. V.; COOKE, M., NICKLESS, G. Effect of sewage treatment on faecal sterols. **Wat. Res.**, v.15, p.1019-1025, 1981.
- MACLEOD, W. D. *et al.* Standard analytical procedures of the NOAA national analytical facility. **Extractable Toxic Organic Components**, ed.2, 1985-1986.
- MAGALHÃES, L. M. S.; CAMPOS, A. F. C. **Aplicação da Nanotecnologia Como Técnica e Controle, Monitoramento e Remediação da Poluição Química da Água**. 2006.
- MARCHAND, J. *et al.* Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the european flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. **Marine Biotechnology**, v.8, p.275–294, 2006.
- MARTINS, C. C. *et al.* Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). **Environmental Pollution**, n.158, p.3355-3364, 2010.
- MARTINS, C. R. O. **Alaviação da estrutura dos postos de vendas de combustíveis do Distrito Federal quanto a geração de resíduos aliada a análise de sua citotoxicidade e genotoxicidade**. Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília. Brasília, 2007.
- MATOS, M. A. C. **Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos e algas de Santos e Cananéia, SP. Brasil**. Tese de Doutorado. Instituto de Química Universidade de São Paulo, p.200, 2002.

MATTOS, J. J. **Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto à fração de óleo diesel acomodada em água.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFSC. Florianópolis, 2010.

MIRANDA, A. L. *et al.* Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, n.34, p.939 – 949, 2008.

MORAIS, S. *et al.* Hepatic transcriptome analysis of inter-family variability in flesh n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content in Atlantic salmon. **BMC Genomics**, n.13, p.410, 2012.

MORENO, P.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do Rio das velhas (MG). **Bioindicadores de Qualidade de Água**, cap.5, p.95-116, 2005.

MORGA, B. *et al.* Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an in vitro infection with *Bonamia ostreae*. **Developmental & Comparative Immunology**, 2010.

MORIBE, H. *et al.* Tetraspanin is required for generation of reactive oxygen species by the dual oxidase system in *Caenorhabditis elegans*. **PLOS Genetics**, v.8, ed.9, sept. 2012.

MOSESSON, M. W.; SIEBENLIST, K. R.; MEH, D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals new york academy of sciences**, 2001.

MURATA, K. *et al.* Cloning of cDNAs for the precursor protein of a low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (Chorion) of the fish *Oryzias latipes*. **Developmental Biology**, v.167, ed.1, p.9–17, jan. 1995.

NADAULD, L. D. *et al.* The *Zebrafish* retinol dehydrogenase, rdh11, is essential for intestinal development and is regulated by the tumor suppressor adenomatous polyposis coli. **The journal of biological chemistry**, v.280, n.34, p.30490–30495, 2005.

NOGUEIRA, L., *et al.* Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, 2011.

NOGUEIRA, P. R. **Molecular biomarkers in fish exposed to xenobiotics**. Tese. Pós- graduação em Biologia - Universidade de Aveiro, 2009.

NOTAR, M; LESKOV, H., FAGANELI, J. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, n.42, p.36-44, 2001.

OFFEN, N.; MEYER, A.; BEGEMANN, G. Identification of Novel Genes Involved in the Development of the Sword and Gonopodium in Swordtail Fish. **Developmental Dynamics**, n.238, p.1674–1687, 2009.

OLIVEIRA, F. A., *et al.* Meio físico. In: T. M. N. Oliveira. (Org.). **Diagnóstico ambiental do rio do Braço**. Joinville, SC: UNIVILLE, p.24-51, 2009.

OLIVEIRA, L. C. **Altas frequências de arraçoamento nas fases iniciais da criação de tilápia em hapas**. Tese de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de Doutor. Botucatu, SP, jul. 2010.

OLSVIK, P. A. *et al.* Transcriptional effects of dietary exposure of oil-contaminated calanus finmarchicus in atlantic herring (*Clupea harengus*). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, n.74, p.508–528, 2011.

PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, n. 3, v. 24, p.390-398, 2001.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista eletrônica de recursos hídricos**, v.1, n.1, p. 20-36, 2004.

PEREIRO, P. *et al.* High-Throughput sequence analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) transcriptome using 454-Pyrosequencing for the discovery of antiviral immune genes. **Plos One**, v.7, may 2012.

PINTO, P. I. S. *et al.* Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using Suppression Subtractive Hybridization. **Molecular Reproduction and Development**, n.73, p.18–329, 2006, a.

PINTO, P. I. S. *et al.* (b) ICI 182,780 has agonistic effects and synergizes with estradiol-17 beta in fish liver, but not in testis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.67, n.4, 2006, b.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia. Life History and Biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, n.283, mar. 1999.

QU, X. *et al.* Construction and analysis of liver suppression subtractive hybridization library of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) intraperitoneally injected with microcystin-LR. **Aquatic Toxicology**, n.105, p.151–156, 2011.

REEVES, A. D.; PATTON, D. Faecal sterols as indicators of sewage contamination in estuarine sediments of the Tay Estuary, Scotland: an extended baseline survey. **Hydrology and Earth System Sciences**, n. 9, p.81–94, 2005.

REYES, A.; SALAZAR, M.; GRANJA, C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 31, p. 23–29, 2007.

ROUGIER, F. *et al.* Non-specific immune response of Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) following copper and zinc exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, ed. 2, p.115–127, 1994.

SÄMY, C. H., *et al.* Estudo do impacto ambiental na bacia do Rio do Braço através de análises ecotoxicológicas. **Revista de Ciências Ambientais**, v.4, n.2, p.45-55, 2010.

SANDEN, M. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating dietary toxic effects of deoxynivalenol contamination in aquaculture feeds. **Food and Chemical Toxicology**, n.50, p.4441–4448, 2012.

SANTUCCI, M. A. *et al.* Cell-Cycle Deregulation in BALB/c 3T3 cells transformed by 1,2-Dibromoethane and folpet pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n.41, p.315–321, 2003.

SCHWACKE, L. H. *et al.* Anaemia, hypothyroidism and immune suppression associated with polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Proceedings of the Royal Society B**, n.279, p.48–57, 2012.

SMITH, H. E. *et al.* Role of cytochrome P450 2c8 and 2j2 genotype in calcineurin inhibitor induced chronic kidney disease. **Pharmacogenet Genomics**, v.11, n.18, p.943–953, nov. 2008.

SOARES, S. R. A.; BERNARDES, R. S.; CORDEIRO NETTO, O. M. Relationship between water supply, sanitation, public health, and environment: elements for the formulation of a sanitary infrastructure planning model. **Cadernos de Saúde Pública**, n.18, v.6, p.1713-1724, 2002.

STEINHAEUER, M. S.; BOEHM, P. D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of the Alaskan Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbon inputs. **Marine Environmental Research**, n.33, p.223-253. 1992.

STRAUB, P.F. *et al.* Suppression Subtractive Hybridization cDNA libraries to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats. **Marine Biotechnology**, v.6, p.386–399, 2004.

SUN, H. *et al.* Catabolism of Branched-Chain amino acids in heart failure: Insights from genetic models. **Pediatr Cardiol**, n.32, p.305–310, 2011.

TANGUY, A. *et al.* Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. **FEBS Journal**, n.272, p.390–403, 2005.

UNEP (United Nations Environment Programme). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment. **Reference methods for marine pollution studies**, p.97, 1992.

UNEP/FAO/IAEA/IOC, Determination of total cadmium, zinc, lead and copper in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Reference Methods for Marine Pollution Studies**, n.11, p.21, 1984a.

UNEP/FAO/IAEA/IOC, Determination of total mercury in selected marine organisms by cold vapour atomic absorption spectrophotometry. **Reference Methods for Marine Pollution Studies**, n.8, p.17, 1984b.

UNIVILLE, UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE. **Projeto canal do Linguado: Estudos da Biota Marinha e Química Ambiental da Baía da Babitonga**. Pró-Reitoria de Extensão e Assuntos Comunitários, 368p., 2004.

URIBE, C. *et al.* Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v.10, n.56, p.486–503, 2011.

USTRA, J. R. **Concentrações de mercúrio na biota e sedimentos no sul do estuário da Lagoa dos Patos**. Dissertação. Pós-Graduação em Engenharia Oceânica – FURG, p.125, 2001.

VENKATESAN, M. I. Occurrence and possible sources of perylene in marine sediments-a review. **Marine Chemistry**, v.25, p.1-27, 1988.

XU, D. *et al.* Differential profiles of gene expression in grouper *Epinephelus coioides*, infected with Singapore grouper iridovirus, revealed by suppression subtractive hybridization and DNA microarray. **Journal of Fish Biology**, n.77, p.341–360, 2010.

WANG, L. *et al.* Expression and possible functional roles of cytochromes P450 2J1 (zfcyp 2J1) in zebrafish. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.352, p.850–855, 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelins for drinking-water quality recommendations**, ed.2, v.1, 1993.

YAOWU, H.; SMITH, R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B **Cellular and Molecular Life Sciences**, n.66, p.1239–1256, 2009.

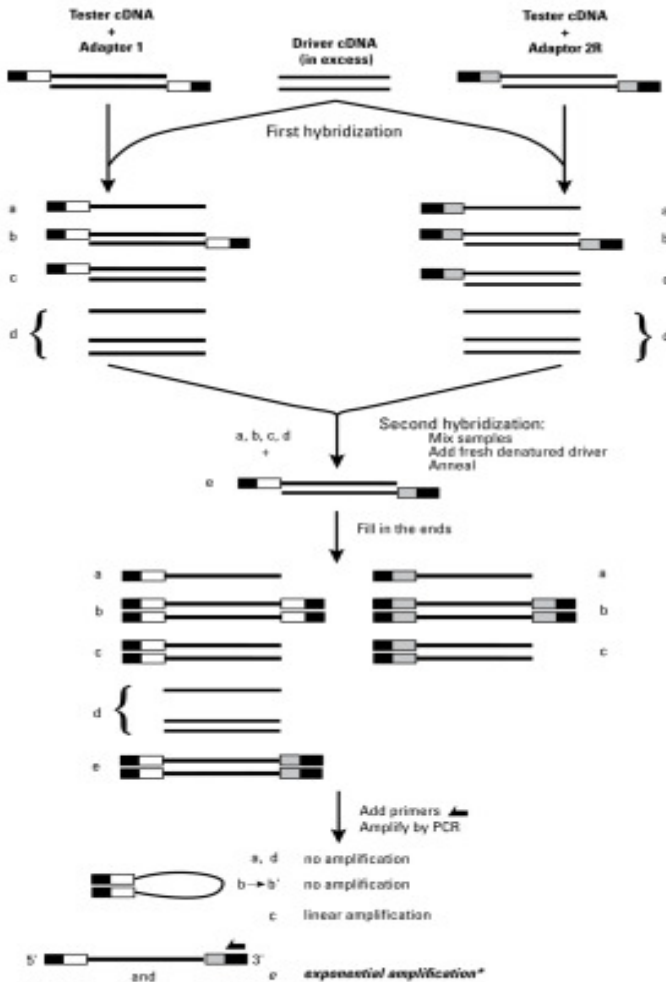
YU, R. M. K. *et al.* Induction of hepatic choriogenin mRNA expression in male marine medaka: A highly sensitive biomarker for environmental estrogens. **Aquatic Toxicology**, n.77, p.348–358, 2006.

ZONOTELLI, C. T. *et al.* **Conhecendo a Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Norte**. Ed. Univille, p.35- 49, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1

Representação esquemática do delineamento experimental da técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva



*Although there is a primer binding sequence on both ends of the type e molecules, the shorter overall homology at the two ends effectively negates the suppression PCR effect—except for very short molecules. See Appendix A for more details on suppression PCR.

ANEXO 2

Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos em amostras de sedimento
($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco)

Composto	REF	S1	S2	S3
C12	<0,003	<0,003	0,018	<0,003
C13	<0,001	<0,001	0,024	<0,001
C14	<0,002	0,007	0,053	0,004
C15	<0,004	0,010	0,099	0,007
C16	0,023	0,010	0,109	0,009
C17	<0,005	0,052	0,241	0,018
Pristano	0,778	<0,008	0,409	0,013
C18	0,040	0,015	0,220	0,011
Fitano	0,004	<0,002	0,370	0,009
C19	0,045	0,016	0,110	0,011
C20	0,017	0,018	0,250	0,016
C21	0,038	0,017	0,093	<0,011
C22	0,012	0,012	0,239	0,011
C23	0,040	0,038	0,465	0,011
C24	0,020	0,018	0,378	0,016
C25	0,095	0,073	0,729	0,034
C26	0,025	0,022	0,391	0,013
C27	0,157	0,162	1,021	0,055
C28	0,041	0,041	0,572	<0,034
C29	0,381	0,476	2,998	0,179
C30	0,047	0,051	0,622	<0,028
C31	0,432	0,640	3,397	0,241
C32	0,047	0,061	0,613	0,028
C33	0,348	0,426	2,126	0,147
C34	0,038	0,035	0,398	0,023
C35	0,164	0,195	0,859	0,071
n-alcanos totais	2,79	2,40	16,8	0,93
Alifáticos resolvidos	2,79	2,40	30,4	1,71
UCM	<5,34	<5,34	173	21,7
Alifáticos totais	2,79	2,40	203	23,4
CPI	7,5	8,8	4,0	10,9
pristano/fitano	203	n.c.	1,10	1,43

*n.c. não calculado

ANEXO 3

Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de sedimento (ng.g⁻¹ – peso seco)

Composto	REF	S1	S2	S3
Naftaleno	2.78	2.47	53.7	80.8
ΣMetilnaftalenos	2.01	1.83	58.7	47.0
Bifenil	<1.30	<1.30	9.92	12.4
ΣEtilnaftalenos	<2.60	<2.60	7.47	9.12
ΣDimetilnaftalenos	3.67	3.37	108	86.9
Acenaftileno	<3.70	<3.70	<3.70	32.0
Acenafteno	<1.30	<1.30	1.54	2.16
ΣTrimetilnaftalenos	1.50	2.21	84.4	43.4
Fluoreno	<1.30	<1.30	3.61	5.50
Σ Metilfluorenos	<1.30	<1.30	12.9	7.53
Dibenzotiofeno	<1.30	<1.30	1.34	<1.30
Fenantreno	<2.60	<2.60	33.1	45.2
Antraceno	<1.10	<1.10	3.16	8.56
ΣDimetilfluorenos	<1.30	<1.30	14.7	34.2
Σ Metildibenzotiofenos	<1.30	<1.30	1.62	<1.30
ΣMetilantracenos	<2.20	<2.20	59.9	48.4
ΣDimetilfenantrenos	<1.30	<1.30	3.13	<1.30
ΣMetilfenantrenos	<2.20	<2.20	6.40	6.28
Fluoranteno	<1.30	<1.30	22.4	42.6
Pireno	<1.30	<1.30	22.6	62.3
ΣMetilfluorantenos	<1.30	<1.30	10.6	14.7
Reteno	<1.30	1.92	16.8	9.9
ΣMetilpirenos	<1.30	<1.30	14.7	18.3
Benzo(c) Fenantreno	<1.20	<1.20	2.02	1.94
Benzo(a)Antraceno	<1.20	<1.20	4.70	5.80
Criseno	<1.20	<1.20	25.9	22.7
ΣMetilcrisenos	<1.20	<1.20	33.3	33.4
ΣDimetilcrisenos	<1.20	<1.20	16.4	16.3
Benzo(b)fluoranteno	<1.30	<1.30	9.46	8.03
Benzo(j)fluoranteno	<1.30	<1.30	8.16	6.94
Benzo(k)fluoranteno	<1.30	<1.30	8.79	7.04
Benzo(e)pireno	<1.30	<1.30	16.4	15.9
Benzo(a)pireno	<1.10	<1.10	9.07	14.3
Perileno	1.63	26.8	471	79.5
Indeno [1,2,3-c,d]pireno	<1.00	<1.00	6.86	8.13
Dibenzo(a,h)antraceno	<1.00	<1.00	1.57	1.41
Benzo(b)criseno	<1.10	<1.10	<1.10	<1.10
Benzo(g,h,i)perileno	<1.20	<1.20	14.7	18.1
ΣHPAs	11.6	38.6	1179	857
ΣHPAs sem perileno	10.0	11.8	708	777
% perileno	14%	69%	40%	9%
ΣHPAs Leves	9.96	9.88	486	512
ΣHPAs Pesados	1.63	28.8	693	345
HPAs Leves/HPAs Pesados sem perileno	n.c.*	5.1	2.2	1.9

*n.c. não calculado

ANEXO 4

Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos em amostras de *Oreochromis niloticus* ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco)

Composto	REF	S1	S2	S3
C12	<0.164	<0.164	<0.164	<0.164
C13	<0.133	<0.133	<0.133	<0.133
C14	<0.117	<0.117	<0.117	<0.117
C15	<0.099	<0.099	<0.099	<0.099
C16	<0.096	<0.096	<0.096	0.13
C17	<0,091	<0,091	<0,091	<0,091
Pristano	<0.093	<0.093	<0.093	<0.093
C18	<0.087	<0.087	<0.087	<0.087
Fitano	<0.085	<0.085	<0.085	<0.085
C19	<0.083	0.22	<0.083	0.32
C20	<0.075	<0.075	<0.075	<0.075
C21	<0.076	0.09	<0.076	0.44
C22	<0.073	<0.073	<0.073	<0.073
C23	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070
C24	<0.071	<0.071	<0.071	<0.071
C25	0.08	0.08	<0.074	<0.074
C26	<0.081	<0.081	<0.081	<0.081
C27	<0.094	<0.094	<0.094	<0.094
C28	0.21	<0.120	<0.120	<0.120
C29	0.39	<0.134	<0.134	<0.134
C30	0.16	0.42	<0.152	<0.152
C31	2.11	1.97	1.14	1.52
C32	0.76	0.41	<0.131	0.19
C33	1.43	1.90	1.20	1.35
C34	0.21	0.17	<0.134	<0.134
Alifáticos Totais	11.2	139	2.35	19.2
Alcanos Totais	5.35	5.24	2.35	3.95
Pristano/fitano	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.
CPI	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MCNR	<5,34	<5,34	<5,34	<5,34

*n.c. não calculado