

GABRIELLE DO AMARAL E SILVA MÜLLER

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM
Crassostrea brasiliana (LAMARCK, 1819) E *Danio rerio*
(HAMILTON, 1822) EXPOSTOS A HIDROCARBONETOS**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta Freire Marques.

FLORIANÓPOLIS
2017

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

Müller, Gabrielle do Amaral e Silva
Respostas bioquímicas e moleculares em *Crassostrea
brasiliiana* (Lamarck, 1819) e *Danio rerio* (Hamilton, 1822)
expostos a hidrocarbonetos / Gabrielle do Amaral e Silva
Müller ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy ;
coorientadora, Maria Risoleta Freire Marques. -
Florianópolis, SC, 2017.
171 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Proteômica. 3. Ecotoxicologia. 4.
Crassostrea brasiliiana. 5. *Danio rerio*. I. Bainy, Afonso
Celso Dias. II. Marques, Maria Risoleta Freire. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. IV. Título.

GABRIELLE DO AMARAL E SILVA MÜLLER

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM
Crassostrea brasiliiana (LAMARCK, 1819) E *Danio rerio*
(HAMILTON, 1822) EXPOSTOS A HIDROCARBONETOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2017.

Prof.a.Dra.Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta Freire Marques
Co-orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a. Yara Maria Rauh Müller
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cláudio Manoel Rodrigues De Melo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Guilherme Razzera
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Alves De Almeida
Universidade Regional de Blumenau

Prof. Dr. Juliano Zanette
Universidade Federal do Rio Grande

Dedico esta tese
à minha mãe pelo apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Afonso Celso Dias Bainy, obrigada por ter confiado a mim este projeto. Agradeço pela sua confiança, apoio e liberdade, os quais foram muito importantes para eu seguir em frente durante estes quatro anos.

À professora Maria Risoleta Marques Freire pelos conhecimentos passados na realização deste trabalho. Obrigada por compartilhar os equipamentos para execução e análise de géis 2-DE.

Ao professor Daniel Schlenk pela oportunidade de aprender uma nova área de estudo sobre embriotoxicidade por um breve período de tempo. Obrigada pela experiência em seu laboratório, pelos conhecimentos de química compartilhados e por ter me proporcionado essa experiência única no exterior.

À professora Karim Hahn Lüchmann pelo tratamento das ostras.

Um agradecimento particular a Ana Paula de Medeiros Fraga (Aninha) e a Graciél Diamante (Gragra) por terem sido pesquisadoras exemplares: disciplinadas, inteligentes e responsáveis. Obrigada por terem compartilhado parte das suas experiências, onde dividimos conhecimentos, bancada e discussões. Agradeço pelo apoio, alegria, conselhos e bom humor muito bem-vindos em momentos difíceis.

Gostaria de enfatizar ainda a colaboração do Jacó Joaquim Mattos por passar seus conhecimentos, experiência e dicas sobre bioquímica e estatística. Obrigada por sanar minhas dúvidas mesmo com suas inúmeras atribuições no laboratório e demais alunos.

Muito obrigada ao professor Guilherme Razzera pelos conhecimentos passados na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório do Laboratório de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI): Bárbara, Camila, Cecília, Cláudia, Clei, Diego, Isis, Fabíola, Fabrício, Flávia, Gabriel, Guilherme, Karla, Laura, Luiz, Marília, Nestor, Rômi e Tomás. Gostaria de agradecer e enaltecer a participação de cada um de vocês no dia a dia do laboratório, pelas risadas, convivência e bons momentos durante todos esses anos.

Um agradecimento todo especial a Daína de Lima com a qual passei bons momentos de risadas e conversas animadas que, com certeza, deixaram meus dias mais leves e alegres.

Obrigada pelo suporte técnico e científico do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) e do laboratório de Proteômica da Universidade Federal do Paraná na identificação de proteínas.

Aos colegas de laboratório do *Environmental Science* da Universidade da Califórnia- Riverside (USA): Graciél, Flávia, Allison,

Marissa, Juliana, Scott e Luiza. Obrigada pelo tempo que passamos juntos no laboratório e por todos os momentos de *coffee breaks* e *happy hours*.

À minha mãe, minha ouvinte, minha conselheira, minha protetora, minha paz, minha luz por suportar minhas tristezas doando-me todo o carinho e atenção. Obrigada por suportar meus momentos difíceis de mau-humor e dúvidas. Tentou de todas as maneiras deixar nosso cotidiano mais leve, esperando-me em casa com muito carinho. Agradeço pela educação que você me passou e principalmente por ter-me servido de inspiração no meu caminho. Muito obrigada pela sua preocupação, doação e participação em todos os momentos da minha vida. Agradeço muito por sua paciência, seu conforto e todo o seu amor.

À minha Vó Dirce juntamente com minha tia Joci pelas orações e preocupações durante minha caminhada. Obrigada por estarem sempre disponíveis a ouvir e dar conselhos, e também por sempre nos receberem em sua casa com muito amor e comilanças.

Gostaria ainda de agradecer à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante os quatro anos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Toxicologia Aquática (INCT-TA/CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) que financiaram todos os experimentos realizados no LABAI.

Agradecemos ao grupo de pesquisa RECOVER (Relationships of Effects of Cardiac Outcomes in fish for Validation of Ecological Risk) ligados ao GOMRI (Gulf of Mexico Research Initiative) pelo apoio financeiro aos experimentos realizados no exterior.

A Deus, meu guia em todos os momentos.

“A ciência exercita a capacidade, não o saber.
O valor de praticar com rigor, por algum tempo,
uma ciência rigorosa não está propriamente em
seus resultados, pois eles sempre serão uma gota
ínfima ante o mar das coisas dignas de saber.
Mas isso produz um aumento de energia, de
capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a
alcançar um fim de modo pertinente.
Neste sentido é valioso, em vista de tudo o que se
fará depois, ter sido homem de ciência”.

(NIETZSCHE, 1878 – 1886, in Humano,
demasiado humano)

RESUMO

O consumo e transporte de petróleo está diretamente ligado à contaminação ambiental por hidrocarbonetos em diversas regiões do mundo. Uma vez no ambiente aquático, o petróleo e seus derivados podem produzir alterações variadas nos organismos expostos, tais como alterações biológicas de caráter molecular, celular, fisiológico ou ecológico, resultando em efeitos danosos às comunidades naturais, incluindo os organismos destinados ao consumo humano. Desta forma, a investigação dessas alterações é urgente como forma preventiva e de avaliação de ambientes aquáticos contaminados. Nesse sentido, o presente trabalho teve como principais objetivos avaliar os efeitos no perfil de proteínas em ostras após exposição à fração de óleo diesel acomodada em água, buscar genes normalizadores em ostras expostas às diferentes condições experimentais e avaliar os efeitos da contaminação do derivado foto-oxidado de petróleo 6-hidroxicriseno em peixes *Danio rerio*. Para atingir esses objetivos, primeiramente, ostras do mangue *Crassostrea brasiliana* foram expostas à fração de óleo diesel acomodada em água durante 24h e 72h com intuito de identificar biomarcadores moleculares. Entre as 11 proteínas expressas diferencialmente, podemos destacar sete: citocromo P450 6A (CYP6A), NADPH citocromo P450 redutase (envolvidas no metabolismo lipídico / xenobiótico), alfa e beta tubulina (envolvidas na formação de fagossomo mediados por retículo endoplasmático - RE), tioredoxina e proteína ubiquitina ligase E3 (envolvidas no processamento e degradação de proteínas no RE). A avaliação de respostas em compartimentos subcelulares mostrou-se bastante sensível e viável para estudos ecotoxicológicos, além de auxiliar na compreensão dos mecanismos que envolvem o RE frente à exposição. Esses dados indicam um papel promissor da avaliação do RE em programas de biomonitoramento ambiental. Entretanto, como muito pouco é conhecido sobre a biologia molecular de *C. brasiliana*, surgiu a necessidade de utilizar genes normalizadores ideais para diferentes condições experimentais para adequada análise da transcrição gênica. Neste trabalho foram identificados diferentes conjuntos de genes adequados para a normalização de dados de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em cada desenho experimental testado. O gene *anquirina* teve maior estabilidade de transcrição e foi considerado candidato promissor como gene normalizador em estudos posteriores. Por fim, com o intuito de aumentar as informações sobre os efeitos de compostos foto-oxidados do petróleo, avaliou-se a exposição de embriões de *D. rerio* ao 6-hidroxicriseno. Foram observadas respostas dos genes relacionados

com transportadores iônicos (*nck1* e *kchna*), associadas à bioacumulação e deformidades cardíacas nos animais nas fases de desenvolvimento embrionário de 74 hpf de exposição.

Palavras-chave: proteômica, PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT), *Danio rerio*, *Crassostrea brasiliana*, FAD, críseno.

ABSTRACT

The consumption and transportation of petroleum are directly linked to the contamination by hydrocarbons in many regions around the world. Once in the aquatic environment, petroleum and its derivatives can produce many alterations to exposed organisms such as biological, cellular, physiological or ecological biological alterations, resulting in harmful effects to natural communities including organisms destined for human consumption. Then, it is urgent the investigation of these impacts in an attempt to prevent and evaluate contaminated aquatic environments. In this context, the main goal of this work was to evaluate the effects of diesel oil water accommodated fraction on the proteomic profile in oysters, search for normalizing genes in oysters submitted to different experimental conditions, and evaluate the effects of photo-oxidized petroleum derivative 6-hydroxycrysene in *D. rerio*. In order to achieve these goals, firstly, the mangrove oyster *C. brasiliiana* were exposed to diesel oil water accommodated fraction for 24h and 72h. Among the 11 differentially expressed proteins, we pointed out seven: cytochrome P450 6A (CYP6A), NADPH cytochrome P450 reductase (involved in lipid / xenobiotic metabolism), alpha and beta tubulin (involved in the formation of RE-mediated phagosome), tioredoxin containg-protein and ubiquitin ligase E3 protein (involved in the processing and degradation of proteins in RE). Subcellular compartments responses had shown to be sensitive and feasible for ecotoxicological studies, besides helping to understand the mechanisms that involve ER in relation to exposure. These data indicate a promising role for ER evaluation in environmental biomonitoring programs. However, few studies had focused on molecular biology of *C. brasiliiana*, there is a necessity to use select normalizing genes ideal for different experimental conditions for adequate analysis of gene expression. In this work, different sets of genes suitable for the normalization of qRT-PCR data were identified in each experimental design tested. The *ankyrin* gene had greater transcriptional stability and was considered a promising candidate as a normalizing gene in later studies. Finally, in order to increase the information about the effects of photo-oxidized petroleum derivative compounds, the exposure by 6-hydroxychrisene in the embryonic development of *D. rerio* was evaluated. In summary, the responses of the genes related to the ionic transporters (*nck1* and *kchna*), together with chemical aspects of bioaccumulation, have been shown to play an important role in the cardiac deformities generated during morphogenesis in the embryonic development stages in 74 hpf of exhibition.

Keywords: proteomics, quantitative real-time PCR (qPCR-RT), *Danio rerio*, *Crassostrea brasiliana* diesel-WAF, chrysene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais matrizes energéticas utilizadas no país de acordo com o consumo de energia nos transportes e consumo geral de energia por fonte. Legenda: ¹ Biodiesel; ² Gasolina da (automotiva); ³ gás de refinaria, coque de carvão mineral e carvão vegetal, dentre outros. FONTE: Balanço energético 2012, ano base 2011 pelo Ministério de Minas e Energia - MME e Empresa de Pesquisa Energética - EPE (BRASIL, 2012).	32
Figura 2. Os maiores acidentes com petróleo em diversas regiões do mundo. Os valores dos volumes dos acidentes são em toneladas. FONTE: CBC News.....	34
Figura 3. Resumo de alguns acidentes por petróleo no Brasil. Os acessos foram realizados em julho de 2014.	35
Figura 4. Estruturas moleculares dos 16 HPA prioritários na lista da Agência de Proteção ambiental americana (<i>Environmental Protection Agency-EPA</i>).	37
Figura 5. Região côncava formada pela ramificação na sequência do anel benzênico em alguns HPA carcinogênicos (indicada pela seta).	38
Figura 6. Estrutura molecular do criseno (A) e 6-hidroxicriseno (B).	40
Figura 7. Mecanismo de ativação de genes por HPA. Fonte: adaptado de (LOSSES; LARGER, 2016).	45
Figura 8. Representação ilustrativa do sistema de preparação da fração de óleo diesel acomodada em água (FAD).	59
Figura 9. Esquema representativo do experimento de exposição de ostras <i>C.brasiliana</i> à FAD por 24h e 72h.....	60
Figura 10. Representação esquemática das eletroforeses para separação das proteínas por massa molecular em géis de poliacrilamida (2-DE). Cada corrida eletroforética foi realizada com quatro géis, sendo dois do grupo controle e dois do grupo exposto do mesmo tratamento (24h ou 72h). Ao final, foram realizadas três corridas eletroforéticas para cada tratamento, sendo 12 géis correspondentes aos animais tratados por 24h (seis géis controle e seis géis exposto) e 12 géis correspondentes aos animais tratados por 72h (seis géis controle e seis géis exposto), totalizando 24 géis bidimensionais.	63
Figura 11. Gel bidimensional (2-DE) representativo contendo as proteínas microssomais de brânquias de <i>C. brasiliana</i> com expressão diferencial $p<0,05$, conforme a análise comparativa entre grupo controle (C) e grupo exposto (E) e a 10% de fração acomodada em água (FAD), em 24 e 72h de exposição: 24Cx24E e 72Cx72E (Master gel). As massas moleculares (MW) com valores na faixa entre 220 a 14,4 estão indicadas ao lado esquerdo do gel e o gradiente de pH 4-7 está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato total protéico solúvel com 300 μ g foi separado por isoeletrofocalização em <i>strip</i> de 13 cm (pH 4-7), a qual foi seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %, sendo o gel fixado, e, posteriormente, corado com CBB G-250. Os círculos vermelhos representam as proteínas diferencialmente expressas no grupo 24h exposto comparado ao grupo controle 24h; os círculos amarelos representam as proteínas expressas diferencialmente no grupo 72h exposto comparado ao grupo controle 72h ($p<0,05$, test t de Student).....	68

Figura 12. Gel bidimensional (2-DE) representativo contendo as proteínas microssomais de brânquias de *C. brasiliiana* que apresentaram expressão diferencial ($p < 0,05$) entre os grupos controle 24 h comparados ao grupo exposto a 10% de fração acomodada em água (FAD) por 24h. As massas moleculares (MW) com valores entre 220 a 14,4 kDa estão indicadas ao lado esquerdo do gel e o gradiente de pH utilizado (pH 4-7) está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato protéico total solúvel correspondente a 300 µg foi separado por isoeletrofocalização em *strip* de 13 cm (pH 4-7) seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. Após a fixação, o gel foi corado com CBB G-250. Os números representam as proteínas diferencialmente expressas no grupo 24h exposto comparado ao grupo controle 24h ($p < 0,05$, test t de Student).....69

Figura 13. Gel bidimensional (2-DE) representativo, contendo as proteínas microssomais de brânquias de *C. brasiliiana* que apresentaram expressão diferencial ($p < 0,05$) na análise comparativa entre os grupos controle 72 h e o grupo exposto a 10% de fração acomodada em água (FAD) por 72 h. As massas moleculares (MW), com valores entre 220 a 14,4 kDa, estão indicadas ao lado esquerdo do gel, enquanto o gradiente de pH (pH 4-7) está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato protéico total solúvel correspondente a 300 µg foi separado por isoeletrofocalização em *strip* de 13 cm (pH 4-7), seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. Após fixação, o gel foi corado com CBB G-250. Os números representam as proteínas diferencialmente expressas no grupo 72h exposto comparado ao grupo controle 72h ($p < 0,05$, test t de Student).....70

Figura 14. Separação de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), referente a ajustes metodológicos envolvendo a extração proteica e a solubilização das proteínas. **(A)** Gel SDS-PAGE referente a extração e solubilização das proteínas. Três métodos diferentes de extração de proteína foram realizados com base na utilização de 100% acetona (linha 2), 2-DE Clean Up Kit (linha 3) e 20% TCA / acetona (linha 4), e comparados visando a preparação do conteúdo de proteínas microssomais. A análise comparativa foi baseada no perfil obtido através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10%, no qual foi utilizada a mesma quantidade de proteína (12,5 µg) para cada um dos homogenatos obtidos. Nota-se a diferença qualitativa e quantitativa do perfil polipeptídico de proteínas microssomais na faixa entre 30-50 kDa. **(B)** Mapa proteômico representativo obtido após focalização isoeletrica na faixa de pH entre 3-10 (13 cm), seguida por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5%. Os géis foram corados por CBB. Nota-se a sobreposição de *spots* na região 50 - 100 kDa na faixa de pI 4 - 7.....73

Figura 15. Diagrama de Venn representando o número de proteínas diferenciamente expresas ($p < 0,05$, test t de Student) entre os géis 2-DE de microssoma de brânquias de *C. brasiliiana* entre grupos controle (C) (24h e 72h) e grupos expostos (E) a 10% de FAD (24h e 72h). Os dados apresentados de cada grupo experimental (24C, 24E, 72C, 72E) são resultado da análise de seis géis (N=6) (triplicatas biológicas e duplicatas técnicas) no programa Image Master Platinum v.7.0 (GE Healthcare). Legenda: Setas azuis representam e proteínas com expressão induzida; Setas amarelas representam proteínas com expressão

reprimida; Os retângulos cinzas estão em destaque as proteínas exclusivas em cada tratamento.74

Figura 16. Número de alteração da expressão das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$, test t de Student) identificadas nesse estudo em microsomas de brânquias de *C. brasiliiana* expostas à FAD por 24 e 72h. A quantidade de alterações foi avaliada de acordo com o percentual de volume (% Vol) de proteína comparado entre os grupos controle e exposto das seis replicadas de géis bidimensionais (2-DE) em cada tratamento (N=6). A indução refere-se à maior expressão de uma dada proteína em comparação ao respectivo controle (24h ou 72h), e, de forma análoga, repressão refere-se à diminuição da expressão de uma dada proteína quando comparada ao respectivo controle (24h ou 72h). Proteínas consideradas significativamente alteradas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo programa Image Master Platinum v.7.0. Legenda: Thr-tiorredoxina; MIB2-ubiquitina ligase E3 (MIB2); PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase; GALAC – beta-1,3-galactosyltransferase; CYP6A – citocromo P450 6A; CYPRED – NADPH citocromo P450 redutase; ATUB- alfa-tubulina; BTUB-beta-tubulina; 14-3-3-proteína zeta; GELSO – Gelsolin; RECEPLU- receptor de glutamato;75

Figura 17. Classificação funcional geral das onze proteínas identificadas, em função de vias/processos celulares, com base nas descrições do KEGG e Uniprot.80

Figura 18. Mapas das vias mediadas pelo retículo endoplasmático (RE) envolvendo duas proteínas identificadas nesse estudo. O mapa gerado pelo KEGG, incorporou as proteínas identificadas (vermelho) em mapas de vias metabólicas do KEGG de *C. gigas* (verde).83

Figura 19. Representação esquemática dos processos gerados na brânquia de *Crassostrea brasiliiana* após exposição a 10% FAD. Esses processos foram propostos de acordo com as proteínas identificadas neste estudo, cujo nível de expressão foi alterado frente a exposição, e com base nas suas respectivas funções, juntamente com dados já reportados na literatura. Após a exposição, componentes da FAD atingem o meio intracelular por meio de difusão. Em seguida, a indução de CYP6A ocorre durante a biotransformação. A proteína NADPH citocromo P450 redutase atua na transferência de elétrons, restaurando o estado redox do CYP6A, aparentemente de forma tempo-depende (72 h). O processo de biotransformação gera a formação de EROS gerando estresse oxidativo. Alterações significativas na expressão das proteínas tiorredoxina e ubiquitina ligase E3 atuam para reduzir o número de proteínas mal enoveladas no RE e, desta forma, restabelecer a homeostase proteica contra o estresse no RE já em 24h de exposição à FAD. Alterações observadas no nível de expressão de proteínas de citoesqueleto no microsoma estão relacionadas ao incremento de resposta fagocítica, e consequente aumento da imunotoxicidade, bem como com alterações no movimento vesicular por actinas e tubulinas em 72h. Além disso, poder-se-ia sugerir que o aumento do estresse oxidativo também possa estar relacionado com o incremento de alterações pós-traducionais em proteínas do próprio citoesqueleto.92

Figura 20. Quadro de valores absolutos de Ct contendo a expressão dos nove genes testados como normalizadores nas três condições experimentais: ostras expostas à FAD; ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas; e ostras expostas a PHE em diferentes salinidades. A mediana está indicada por uma linha em cada caixa na horizontal, que por sua vez representa o percentual entre 25 e 75. Traços para baixo indicam o menor valor e para cima até o maior.....	112
Figura 21. Análise da estabilidade da transcrição dos genes testados como normalizadores após exposição a PHE em diferentes temperaturas. Os valores de estabilidade dos nove genes foram avaliados em cada condição experimental e calculados com RefFinder (A), GeNorm (B) e Normfinder (C). Os valores mais baixos representam transcrição gênica mais estável.	113
Figura 22. Análise da estabilidade da transcrição dos genes testados como normalizadores nos animais expostos a PHE em diferentes salinidades. Os valores de estabilidade dos nove genes testados foram avaliados em cada condição experimental e calculados com RefFinder (A), GeNorm (B) e Normfinder (C). Os valores mais baixos representam transcrição gênica mais estável.	114
Figura 23. Análise da estabilidade da transcrição dos genes testados como normalizadores em ostras expostas à FAD. Os valores de estabilidade dos nove genes testados foram avaliados em cada condição experimental e calculados com RefFinder (A), GeNorm (B) e Normfinder (C). Os valores mais baixos representam transcrição gênica mais estável.	115
Figura 24. A análise de estabilidade da transcrição dos nove genes testados como normalizadores foi calculada por ΔCt e BestKeeper. Estabilidade de transcrição dos genes normalizadores nas seguintes amostras: A) Exposição a PHE em diferentes temperaturas; B) Exposição a PHE em diferentes salinidades C) exposição à FAD.	117
Figura 25. Mecanismo molecular hipotético testado nesse estudo por meio da via estrogênica não clássica através da ativação de receptor de estrogênio ligado à proteína G (GPER), desregulação de genes cardíacos e posterior malformação fenotípicas cardíacas.....	131
Figura 26. Estágios do desenvolvimento do peixe-zebra. FONTE:< http://www.devbio.biology.gatech.edu >.....	134
Figura 27. Efeitos do 6-OHCHN nos diferentes estágios de desenvolvimento de peixes-zebra. Percentagem de sobrevivência (A) e deformidades cardíacas (B) após tratamento com 0,5 μM e 5 μM 6-OHCHN por 74 h e 0,12% etanol nos estádios de desenvolvimento de 2 hpf, 5 hpf, 10 hpf e 24 hpf. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle de cada estágio de desenvolvimento (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).....	143
Figura 28. Efeitos de 6-OHCHN na sobrevivência e deformidade cardíaca em embriões de peixe-zebra (2 hpf). Percentagem de sobrevivência (A) e percentagem de deformidades cardíacas (B) após 74h de tratamento nas concentrações de 0,5, 3, 5 e 8 μM de 6-OHCHN e 0,1% de etanol. (C) Mortalidade acumulada de embriões de peixe-zebra tratados com 6-OHCHN após 26, 50 e 74 h. (D) Deformidades fenotípicas embriões de peixe-zebra tratados	

com 6-OHCHN por 76hpf. PE: edema pericárdico induzido por 6-OHCHN; YE: edema do saco vitelino.....	145
Figura 29. Efeitos de 6-OHCHN na sobrevivência de peixe-zebra após exposição por 76 hpf seguida de transferência para água limpa por mais três dias. Percentagem de sobrevivência após 74h de tratamento com 0,5 e 5 µM de 6-OHCHN e 0,1% etanol. Asterisco indica diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, p <0,05).....	146
Figura 30. Efeitos de 6-OHCHN na expressão gênica de LRRC10, GPER, GATA4 e CAMK em embriões de peixe-zebra. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, p <0,05).	147
Figura 31. Efeitos de 6-OHCHN na expressão de gênica de <i>NCX1</i> e <i>KCHN2A</i> em embriões de peixe-zebra. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, p <0,05).	148
Figura 32. Efeitos de 6-OHCHN na expressão gênica <i>BIP</i> e <i>RYR</i> em embriões de peixe-zebra. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, p <0,05).	148
Figura 33. Percentagem de sobrevivência e de deformidades em larvas de peixe-zebra após 76hpf tratados com o antagonista seletivo do GPER (G-15) juntamente ao 6-OHCHN. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, p <0,05).....	149
Figura 34. Avaliação da ligação de 6-OHCHN a AhR em embriões de peixe-zebra (76 hpf). Os números 1 a 9 representam o controle positivo do ensaio de células com tetraclorodibenzodioxina 2,3,7,8 (TCDD), seguida pelas diferentes repetições de 6-OHCHN (0,0015 µM a 10 µM).	150
Figura 35. Avaliação fluorimétrica de peixe-zebra no estágio embrionário e larval após exposição ao composto 6-OHCHN por 76hpf. As visualizações foram feitas com estereomicroscópio Olympus MVX10 MacroView acoplado com Olympus DP72 Digital Color Camera. A intensidade de fluorescência foi quantificada em cada embrião usando o software Imagem J 1.50D.	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Avaliação da detecção e comparação (<i>match</i>) de cada <i>spot</i> nas seis replicatas de géis (2-DE) de cada grupo experimental.....	67
Tabela 1. Protocolos testados para separação de proteínas por ponto isoelétrico (IEF).	71
Tabela 3. Proteínas microssomais de <i>C. brasiliiana</i> , identificadas por perfil de massas de peptídeos (PMF; MS) e seqüenciamento de peptídeos (MS/MS), após exposição a 10% FAD por 24 e 72h.	77
Tabela 4. Vias bioquímicas mediadas pelo retículo endoplasmático (RE) de algumas das proteínas de <i>Crassostrea brasiliiana</i> identificadas nesse estudo....	81
Tabela 5. Sequência de iniciadores utilizadas para as análises de qRT-PCR..	106
Tabela 6. Valores <i>cycles threshold</i> (Ct) e eficiências (E) da qRT-PCR dos genes de referências candidatos.	110
Tabela 7. Classificação de acordo com a estabilidade dos nove genes de referência analisados pelo algoritmo RefFinder.	118
Tabela 8. Sequências iniciadoras, números de acesso (NCBI) e tamanho do produto amplificado (<i>amplicon</i>).	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE	Agência de Energia Internacional
BLAST	Algoritmo para comparação de sequências biológicas utilizando alinhamento local; do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTp	Busca em um banco de sequências de proteínas a partir de uma sequência de proteínas, utilizando o algoritmo BLAST
BSA	Albumina Bovina Sérica
CBB	Azul de Coomassie Brilhante G-250
CHAPS	3 - [(3-Cholamidopropyl)dimetilamônio]-2-hidroxi-1-propanesulfonato
Ct	Limiar de detecção em uma reação de qPCR; do inglês <i>cycle threshold</i>
CYP450	Citocromo P450 – número após a sigla representa família
ddNTP	Dideoxynucleotídeo trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EC	Número de classificação de enzimas; do inglês <i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência de Proteção Ambiental Americana (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>).
RE (ER)	Retículo endoplasmático; do inglês <i>endoplasmic reticulum</i>
FAD (WAF)	Fração acomodada em água; do inglês <i>water accommodated fraction</i>
CROSERF	Fórum de Pesquisas sobre os Efeitos Ecológicos e Químicos por Derramamento de Petróleo
GenBank	Banco de dados do NCBI
HPA (PAH)	Hidrocarboneto policíclico aromático; do inglês <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
IEF	Focalização Isoelétrica
IPG	Gradiente de pH imobilizado, do inglês <i>Immobilized pH gradient</i>
KDa	Quilodalton
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto; do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>

KO	Números de ontologia KEGG; do inglês <i>KEGG ontology</i>
IPG	Gradiente imobilizado de pH
L	Litro
M	Molar
ma	milliampere
MME	Ministério de Minas e Energia
MALDI-TOF	Dessorção/ionização a laser em matriz assistida - tempo de voo
MS	Espectrometria de massa
MW	Massa molecular
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA; do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida
pI	Ponto isoelétrico
Pfam	Banco de dados para classificação de proteínas
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PMF	Impressão digital de peptídeo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Perfil de expressão protéica
qPCR-RT	PCR quantitativo em tempo real
r	Coefficiente de correlação de Pearson
RPM	Rotações por minuto
S.D.	Desvio padrão; do inglês <i>standard deviation</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S.E.M.	Erro padrão da média; do inglês <i>standard error of the mean</i>
Spot	Ponto que corresponde / delimita proteínas em um gel
2-DE	
Strip	Tira desidratada de poliacrilamida
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Hidroximetilaminometano
UniProt	Banco de dados de proteínas; do inglês <i>Universal Protein Resource</i>
V	Volt
v/v	Volume/volume
w/v	Peso/volume; do inglês <i>weight/volume</i>

$\Delta\Delta Ct$	Método comparativo de Ct para quantificação relativa da transcrição do gene de interesse
2-DE	Eletroforese bidimensional
Σ	Total, soma
\sim/\pm	Aproximadamente

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	31
1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR ÓLEO DIESEL E SEUS DERIVADOS	36
1.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL COM ANIMAIS AQUÁTICOS	41
1.3 BIOMARCADORES MOLECULARES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	43
1.4 PROTEÔMICA AMBIENTAL.....	46
1.5 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR-RT).....	48
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS MICROSSOMAS DE <i>Crassostrea brasiliana</i> EXPOSTAS À FRAÇÃO DE ÓLEO DIESEL ACOMODADA EM ÁGUA (FAD)	51
ABSTRACT	52
RESUMO	53
2.1 INTRODUÇÃO.....	54
2.2 OBJETIVOS	57
2.2.1 OBJETIVO GERAL	57
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.3.1 ANIMAIS	58
2.3.2 PREPARAÇÃO DE FAD E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	58
2.3.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	60
2.3.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA (2-DE).....	61
2.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
2.3.6 DIGESTÃO TRÍPTICA <i>IN-GEL</i> E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS).....	63
2.3.7 IDENTIFICAÇÃO PROTEICA	65
2.4 RESULTADOS	67
2.4.1 ALTERAÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA (PEPS)	67
2.4.2 FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR KEGG	80
2.5 DISCUSSÃO	84
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
2.7 PERSPECTIVAS.....	94
CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DAS RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS DE GENES NORMALIZADORES EM <i>Crassostrea brasiliana</i> SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	95
ABSTRACT	96
RESUMO	97
3.1 INTRODUÇÃO.....	99
3.2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	101

3.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	101
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	102
3.3.1 ANIMAIS.....	102
3.3.2 EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO.....	102
3.3.2.1 SALINIDADE OU TEMPERATURA COMBINADA COM EXPOSIÇÃO POR FENANTRENO (PHE).....	102
3.3.2.2 EXPOSIÇÃO À FRAÇÃO DE ÓLEO DIESEL ACOMODADA EM ÁGUA (FAD).....	103
3.3.3 SELEÇÃO DE GENES NORMALIZADORES E DESENHO DE INICIADORES.....	103
3.3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA.....	105
3.3.5 ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QRT-PCR).....	107
3.3.6 ANÁLISE DA ESTABILIDADE GÊNICA.....	107
3.4 RESULTADOS.....	109
3.4.1 EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA POR QPCR-RT.....	109
3.4.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA PELO MÉTODO REFFINDER.....	111
3.4.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA USANDO OS DEMAIS MÉTODOS MATEMÁTICOS.....	115
3.4.3.1 MÉTODO GENORM.....	115
3.4.3.2 MÉTODO NORMFINDER.....	116
3.4.3.3 MÉTODO DELTA CT.....	116
3.4.3.4 MÉTODO BESTKEEPER.....	116
3.5 DISCUSSÃO.....	119
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
3.7 PERSPECTIVAS.....	124

CAPÍTULO 4 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO 6-HIDROXICRISENO NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i>)	125
ABSTRACT.....	127
RESUMO.....	128
4.1 INTRODUÇÃO.....	129
4.2 OBJETIVOS.....	132
4.2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	132
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	132
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	133
4.3.1 ANIMAIS.....	133
4.3.2 ENSAIO DE SENSIBILIDADE AO 6-HIDROXICRISENO (6-OHCHN).....	133
4.3.3 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	134
4.3.4 ENSAIO DE TOXICIDADE EMBRIO-LARVAL.....	135
4.3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, SÍNTESE DE CDNA E DESENHO DE INICIADORES.....	135

4.3.6 ANÁLISES DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QRT-PCR)	136
4.3.7 ENSAIO DE CO-EXPOSIÇÃO COM G-15 E 6-OHCHN	137
4.3.8 AVALIAÇÃO DE 6-OHCHN EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA	137
<i>LEUCINE RICH REPEAT CONTAINING 10</i>	138
4.3.9 TRANSATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE HIDROCARBONETO DE ARILA (AHR)	140
4.3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	140
4.4 RESULTADOS	142
4.4.1 TOXICIDADE INDUZIDA POR 6-OHCHN	142
4.4.2 ENSAIO DE TOXICIDADE	144
4.4.3 ENSAIO DE TOXICIDADE EMBRIONÁRIA E LARVAL	145
4.4.4 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE GENES CARDÍACOS	146
4.4.5 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE GENES TRANSPORTADORES DE ÍONS	147
4.4.6 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE GENES EM RESPOSTA ÀS PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS	148
4.4.7. CO-EXPOSIÇÃO COM G-15 E 6-OHCHN	149
4.4.8 TRANSATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE HIDROCARBONETO DE ARILA (AHR)	149
4.4.9 AVALIAÇÃO DE 6-OHCHN EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA	150
4.5 DISCUSSÃO	152
4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
4.7 PERSPECTIVAS	158
CAPÍTULO V – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	159
ANEXO I	161
REFERÊNCIAS	165

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

Grande parte da população mundial (aproximadamente 40%) encontra-se localizada em áreas costeiras (UNEP, 2005). A migração da população para essas regiões está associada às atividades turísticas e de veraneio, transporte marítimo, fonte de alimentos e, por fim, a instalação de atividades industriais em busca de consumidores. No Brasil, nas últimas cinco décadas, tem se intensificado o número de parques industriais próximos ao litoral. O crescimento populacional associado a estas atividades acarretam em um aumento na contaminação de efluentes, os quais são lançados diretamente ao mar, comprometendo a biota aquática (NETO et al., 2008).

Dentre as indústrias que vêm crescendo no Brasil, destaca-se a indústria petrolífera com alto desenvolvimento tecnológico para exploração de combustíveis fósseis (FILHO, 2006). O crescimento da exploração do petróleo está associado ao aumento de seu consumo. Atualmente, a principal fonte energética mundial é o petróleo, que corresponde a 90% de todo o combustível utilizado nos transportes e acredita-se que esse valor seja mantido pelos próximos anos de acordo com a Agência de Energia Internacional (AIE) (FILHO, 2006; CHAVEZ-RODRIGUEZ; NEBRA, 2010). Em um cenário mais otimista, especula-se que os combustíveis fósseis irão corresponder a 50% da matriz energética mundial em 2050 (CHAVEZ-RODRIGUEZ; NEBRA, 2010). De acordo com o Ministério de Minas e Energia, o petróleo e seus derivados estão entre as principais matrizes energéticas do Brasil, sobretudo o óleo diesel que compreende 47,3% do consumo de energia nos transportes e 19,1% no consumo final de energia (indústrias, etc.) (BRASIL, 2007, 2012) (Figura 1). Nos transportes, o óleo diesel é amplamente utilizado como combustível por grandes embarcações, máquinas, veículos rodoviários, entre outros (KENNISH, 1992; BRASIL, 2012).

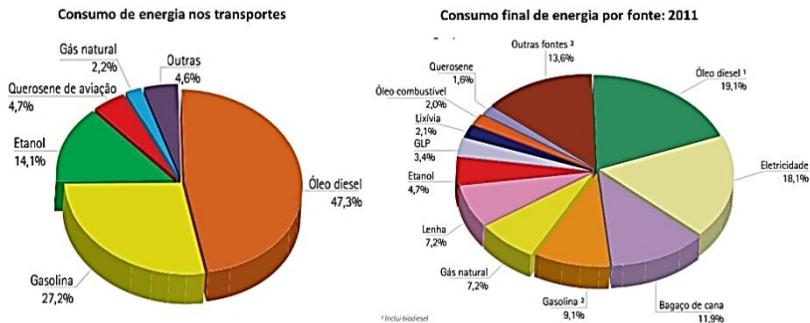


Figura 1. Principais matrizes energéticas utilizadas no país de acordo com o consumo de energia nos transportes e consumo geral de energia por fonte. Legenda: ¹Biodiesel; ²Gasolina da (automotiva); ³gás de refinaria, coque de carvão mineral e carvão vegetal, dentre outros. FONTE: Balanço energético 2012, ano base 2011 pelo Ministério de Minas e Energia - MME e Empresa de Pesquisa Energética - EPE (BRASIL, 2012).

Apesar do papel fundamental da indústria na economia mundial, as indústrias petrolíferas destacam-se por constituírem um fator de risco ambiental. Elas são utilizadas na produção de energia e no fornecimento de matéria-prima para outros tipos de indústria, porém, sua atividade está ligada a geração de impacto ambiental por derramamentos de petróleo e por descargas do consumo de combustíveis (FILHO, 2006). Segundo a Resolução nº273 do CONAMA (2000) as instalações de sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se em empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais (CONAMA, 2000). Neste contexto, a recente descoberta de reservas petrolíferas em águas brasileiras, conhecidas como pré-sal, projetou o país como um dos maiores produtores mundiais de petróleo bruto (CHAVEZ-RODRIGUEZ; NEBRA, 2010). Com isso tem sido observado um aumento no número de projetos relacionados com exploração, produção e transporte de petróleo. Cada vez mais vem se tornando necessário o monitoramento das atividades petrolíferas devido à grande possibilidade de contaminação e exposição de animais marinhos ao petróleo e seus derivados (WERTHEIM, 2009).

Os impactos ambientais da indústria petrolífera podem ser causados por uma exposição aguda ou crônica dos seus efluentes. Os acidentes ambientais decorrentes de derrames de petróleo estão relacionados a efeitos danosos na biota aquática e nos ecossistemas como um todo (HOLDWAY, 2002). Dados recentes mostram que 196 mil

toneladas de óleo foram despejadas entre 2010 e 2016 de acordo com *International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF)*. No mapa da Figura 2 é possível verificar alguns dos maiores acidentes com derramamento de óleo e o volume derramado em diversas regiões do mundo. Em escala mundial, destacam-se alguns acidentes: em julho de 1979, a colisão entre os petroleiros *Atlantic Empress* e *Aegean Captain* ocasionou o derramamento de 287.000 m³ de óleo na região de Trinidad e Tobago; em 1989 o petroleiro Exxon Valdez derramou sua carga de aproximadamente 37.000 m³ de petróleo na costa do Alasca; o rompimento do tanque Prestige na costa da Espanha, em 2002, causando o vazamento de mais de 60.000 m³ de óleo combustível (ITOPF, 2010). Entretanto, o caso mais alarmante foi o acidente da plataforma *Deepwater Horizon* (DWH) no Golfo do México nos Estados Unidos. A plataforma explodiu, resultando no vazamento de cerca de 780.000 m³ de petróleo entre os meses de abril e julho de 2010. Diversos autores consideram este como o maior desastre ambiental envolvendo a indústria do petróleo, tendo em vista a localização do acidente e a ampla dispersão do produto (ANTONIO; MENDES; THOMAZ, 2011; BARRON, 2012).

No Brasil, os acidentes envolvendo atividades petrolíferas também receberam destaque na mídia e estão mostrados na Figura 3. Entre estes destacam-se : em 1993, 2,7 milhões de litros de óleo alcançaram a praia de Maresias (São Paulo) decorrente de vazamento de oleoduto; em 2009, ocorreu o derrame de 20 mil litros de combustível no Rio Porus (Acre) e formou-se uma mancha de óleo com mais de 300 km na região; em 2012, o vazamento do oleoduto derramou 1,2 mil litros em Morretes (Paraná); em 2012, o tombamento de um caminhão-tanque na rodovia SP-55, causando o derrame de 15 mil litros de óleo diesel em um córrego que atingiu a costa na praia de Maresias (São Paulo); em 2012, o trem que carregava mais de um milhão de litros de óleo diesel descarrilhou em Bauru (São Paulo) contaminando solos e rios da região; na região entre Guarapuava e Cascavel (Paraná), ocorreu o descarrilhamento de 12 vagões de trens derramando um milhão de litros de óleo diesel em 2013; entre outros (acessos em junho de 2014 em <http://g1.globo.com/>). Apesar dos derramamentos de petróleo serem amplamente divulgados na mídia, a contaminação crônica é a principal fonte de contaminação por petróleo no ambiente aquático com pequenos e contínuos vazamentos de tanques de armazenagem em grande quantidade, que atingem águas subterrâneas e posteriormente rios (FILHO, 2006).

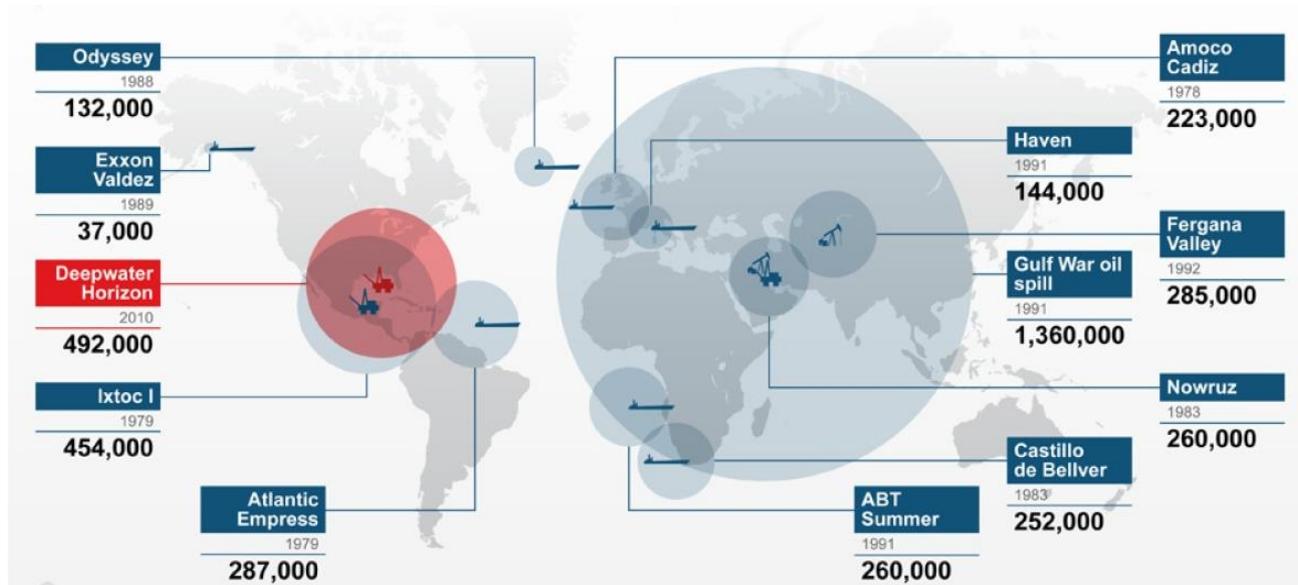


Figura 2. Os maiores acidentes com petróleo em diversas regiões do mundo. Os valores dos volumes dos acidentes são em toneladas. FONTE: CBC News.

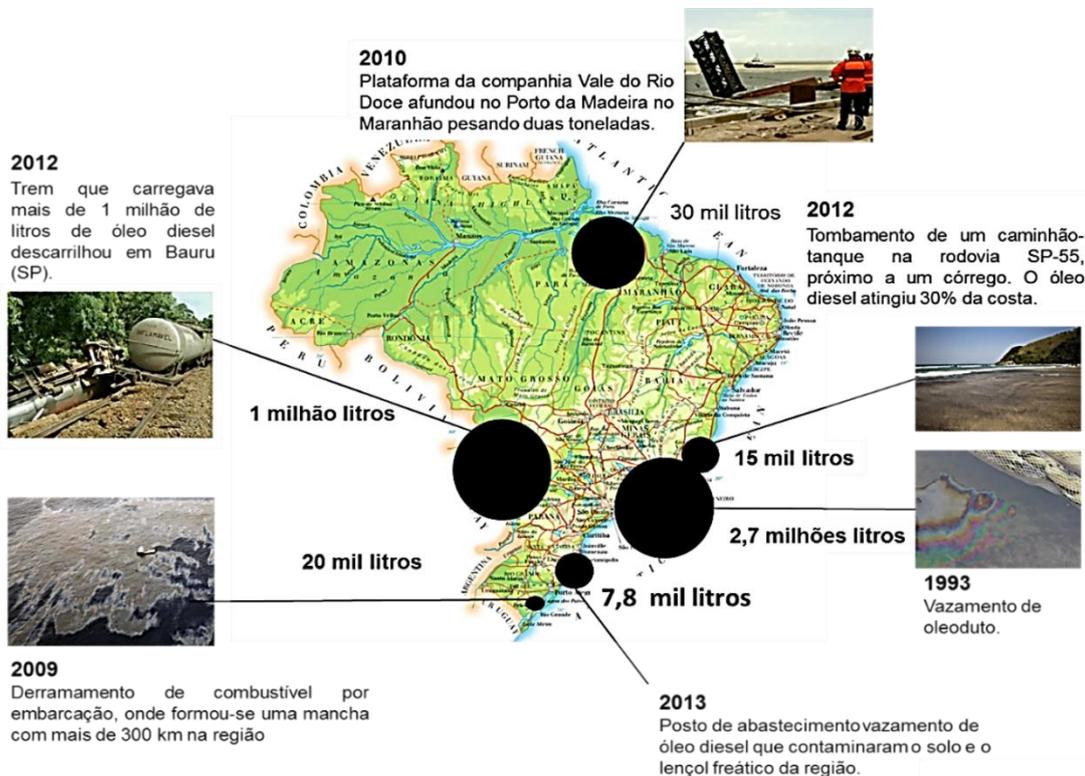


Figura 3. Resumo de alguns acidentes por petróleo no Brasil. Os acessos foram realizados em julho de 2014.

1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR ÓLEO DIESEL E SEUS DERIVADOS

O óleo diesel é constituído tipicamente por hidrocarbonetos alifáticos (como parafinas) e apenas uma pequena porção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) que compreendem de 0,2% a 7,0%. Em geral, a maioria dos HPA que constituem o óleo são monocíclicos ou BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), que apresentam apenas um anel aromático seguido pelos policíclicos com dois a quatro anéis aromáticos fusionados (HPA). Destes, os mais representativos são aqueles que contêm de dois a quatro anéis. Dentre os HPA, o naftaleno e fenantreno e seus derivados metilados e/ou alquilados, são os mais frequentemente encontrados no óleo diesel (NEFF, 2002).

Os HPA possuem alta hidrofobicidade e baixa tendência a degradação microbiana, o que contribui para a sua persistência no ambiente. Além disso, os HPA em geral são facilmente bioacumuláveis e podem gerar toxicidade para alguns organismos aquáticos (BURGESS; AHRENS; HICKEY, 2003). Devido a seu caráter carcinogênico e mutagênico, dezesseis HPA são considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana (U.S. *Environmental Protection Agency* - EPA) (FAKSNESS; JOHAN; SYDNES, 2008), os quais estão listados na Figura 4.

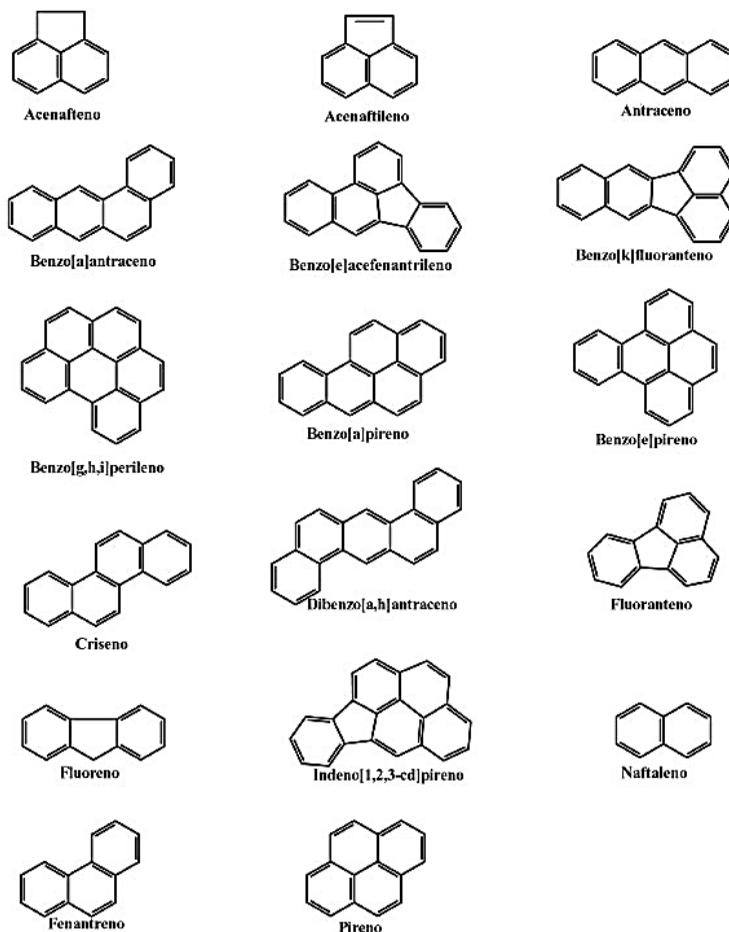


Figura 4. Estruturas moleculares dos 16 HPA prioritários na lista da Agência de Proteção ambiental americana (*Environmental Protection Agency-EPA*).

O caráter carcinogênico é devido a posição relativa entre os anéis benzênicos condensados, sendo que os mais potentes cancerígenos possuem uma região côncava formada pela ramificação na sequência do anel benzênico (Figura 5). Esta configuração molecular fornece um alto grau de reatividade bioquímica com as macromoléculas biológicas como DNA e proteínas (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). De acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005 alguns HPA estão listados com valores que podem ser encontrados na água salobra para cultivo e pesca

(Classe I) como criseno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno e indeno(1,2,3cd)pireno no valor de até 18 ng.L⁻¹. Na água potável o nível de HPA é por volta de 5 ng.L⁻¹.

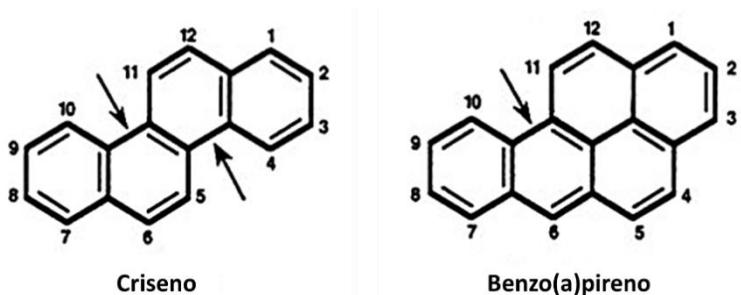


Figura 5. Região côncava formada pela ramificação na sequência do anel benzênico em alguns HPA carcinogênicos (indicada pela seta).

Entre os diferentes tipos de poluentes, o estudo da toxicidade de alguns derivados de petróleo é relevante para ecotoxicologia aquática em função das propriedades já citadas como persistência no ambiente, propriedades cancerígenas e/ou mutagênicas de alguns congêneres e devido aos acidentes recorrentes (BURGESS; AHRENS; HICKEY, 2003). Devido à baixa solubilidade em água do óleo diesel, a investigação dos seus efeitos em laboratório envolve a preparação de frações. A fração acomodada em água (FAD) consiste na fração solúvel dos HPA que ficam na parte inferior de uma mistura óleo/água, na parte superior forma-se um filme insolúvel. De acordo com o Fórum de Pesquisas sobre os Efeitos Ecológicos e Químicos por Derramamento de Petróleo (CROSERF), a FAD é definida como “solução preparada em laboratório com produtos de petróleo (óleo) e água, derivado de um processo de baixa energia (pouco vórtex) sendo que as partículas livres são bem diminutas, ou seja, menores que 1 μm ” (HOKSTAD et al., 1999). A CROSERF desenvolveu o protocolo de preparação de FAD para a padronização de metodologias para a determinação da toxicidade aguda em organismos aquáticos (FAKSNESS; JOHAN; SYDNES, 2008). Considera-se que a preparação de FAD contém a maior concentração de hidrocarbonetos derivados de petróleo na fração solúvel esperada em um derrame por petróleo (FAKSNESS; JOHAN; SYDNES, 2008).

Para tentar elucidar as respostas celulares geradas em animais aquáticos expostos aos contaminantes ambientais de origem petrogênica, estudos em laboratórios envolvendo a exposição de animais à FAD vem sendo realizados. Trabalho com o peixe *Prochilodus lineatus* expostos à FAD por 6h, 24h, 96h e 15 dias, mostraram ativação de vias de biotransformação e uma relação tempo-dependente com a atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Além disso, foi observada uma redução nos níveis de hemoglobina, aumento dos níveis de glicose e quebras na molécula de DNA. Os órgãos mais afetados foram as brânquias e o fígado (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Saco-Álvarez (2008) e colaboradores avaliaram a toxicidade de FAD no mexilhão *Mytilus galloprovincialis* e no ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* com óleos oriundos de diferentes fontes de contaminação. A concentração de FAD que causa efeito em 50% dos organismos testados (EC50) foi de 13% para mexilhão e 10% para ouriço-do-mar (óleo oriundo da Prestige) e de 50% e 20% com testes de óleo de outro local para ouriço e mexilhão, respectivamente (SACO-ALVAREZ et al., 2008). No trabalho de Mattos e colaboradores (2010) o peixe *Poecilia vivipara* foi exposto a 2,5%, 5 %, 10% e 20% de FAD por 96h e não apresentou nenhuma letalidade. Diversos marcadores bioquímicos foram avaliados e verificou-se alteração na atividade de enzimas de biotransformação e em menor grau de enzimas antioxidantes (MATTOS et al., 2010). Com concentrações similares de FAD (2,5%, 5%, 10% e 20%), a ostra *Crassostrea brasiliana*, exposta por 96h, apresentou bioacumulação de maneira dose-dependente com maior proporção de HPA de dois anéis aromáticos (como naftaleno) e com três anéis (como o fenantreno). Nas brânquias, foi verificada a inibição de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) de maneira dose-dependente. Proteínas de estresse como a HSP60 e a enzima gama-glutamyltranspeptidase (GGT) apresentaram um aumento em sua expressão avaliada por *western blotting* (LÜCHMANN et al., 2011).

Em ambiente marinho, o petróleo pode sofrer alterações causadas por fatores abióticos como temperatura, pressão e raios ultravioleta que podem modificar sua estrutura físico-química, podendo resultar em compostos com maior toxicidade (TANSEL et al., 2011). Neste contexto, a foto-oxidação pode desempenhar um papel importante na degradação do petróleo no ambiente marinho com intensa radiação solar e temperaturas mais elevadas. A oxidação fotoquímica resulta na formação de fotoprodutos oxigenados que têm efeitos tóxicos maiores do que os compostos parentais em ambiente marinho (SAEED et al., 2011).

Em geral, os HPA e os hidrocarbonetos heterocíclicos podem absorver a energia da radiação e transferi-la para uma molécula de oxigênio, criando um radical hidroxila capaz de causar danos ao DNA e/ou à membrana plasmática através da peroxidação lipídica (SACO-ALVAREZ et al., 2008). Os produtos da foto-oxidação exercem efeitos adversos sobre diversos organismos como algas (LACAZE; VILLEDON DE NAÏDE, 1976), bactérias (PENGERUD et al., 1984), invertebrados marinhos e peixes (BERTILSSON; WIDENFALK, 2002).

Entre os HPA encontrados no petróleo bruto, o criseno é um dos mais persistentes na coluna d'água e pode sofrer foto-oxidação, produzindo derivados potencialmente oxigenados tais como 6-hidroxicriseno (6-OHCHN) (Figura 6). O criseno foi considerado o HPA mais estável na coluna de água oriundo do derramamento de óleo da *Deepwater Horizon* (DWH) no golfo do México. Sua meia-vida em águas rasas é de mais de 2,5 anos, enquanto nas águas profundas é de quase 5 anos (TANSEL et al., 2011).

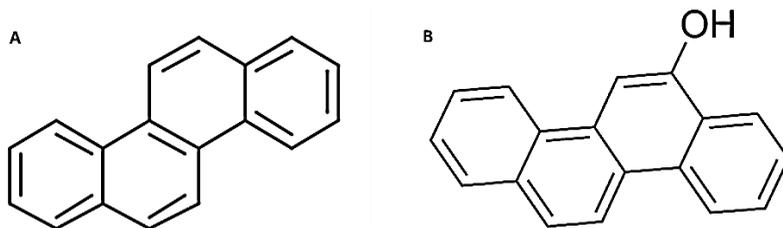


Figura 6. Estrutura molecular do criseno (A) e 6-hidroxicriseno (B).

Os efeitos dos HPA em embriões de peixes estão bem descritos na literatura, os quais revelam uma série de efeitos letais e sub-letais comuns como edema pericárdico e no saco vitelínico, reduções da mandíbula, defeitos esqueléticos descritos como lordose ou escoliose (curvatura dorsal) e anormalidades do desenvolvimento do sistema nervoso (INCARDONA et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos moleculares causados HPA hidroxilados (OHHPA) em animais aquáticos. Os HPA podem ser hidroxilados pelo processo de biotransformação gerando metabólitos hidrofílicos em fígado de peixes, os quais são posteriormente armazenados na bile para excreção intestinal (D' ADAMO, R;PELOSI S; TROTTA, P.; SANSONE, 1997). Nesse caso, os HPA hidroxilados resultantes são fortemente associados a lesões

e neoplasias hepáticas em peixes bentônicos (BAUMANN; HARSHBARGER, 1995).

Tendo em vista a complexa contaminação do meio aquático por fontes de petróleo, atualmente, há uma crescente demanda por ferramentas sensíveis para avaliação dos impactos antrópicos nas populações naturais ameaçadas. Neste contexto, programas de biomonitoramento ambiental são propostos com o intuito de alertar e prevenir danos nos ecossistemas.

1.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL COM ANIMAIS AQUÁTICOS

A avaliação do risco ambiental (ERA) baseia-se principalmente na determinação dos níveis de contaminantes e análise dos possíveis efeitos nos vários compartimentos do ecossistema, e na comparação destas concentrações com valores estabelecidos legalmente ou em normas de segurança ambiental (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Existe uma tendência crescente em avaliar o comportamento dos poluentes (biodisponibilidade, bioacumulação e biotransformação), bem como os efeitos causados pela poluição nos organismos aquáticos para avaliar ou prever o impacto dos produtos químicos nos ecossistemas aquáticos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, 2006). Essa avaliação se realizada em várias espécies de diferentes grupos taxonômicos de um determinado ambiente seria demasiado longa. Assim, alguns grupos taxonômicos têm sido utilizados como modelo na avaliação da qualidade ambiental. Van Gestel e Van Brummelen (1994) definiram os termos "biomarcador", "bioindicador" e "indicador ecológico", ligando-os a diferentes níveis de organização biológica. Eles consideraram um biomarcador como qualquer resposta biológica a uma substância química ambiental no nível sub-individual, avaliada dentro de um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, pelos, etc.). O bioindicador é definido como um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu habitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento identificando potenciais alterações ao longo do tempo e o indicador ecológico é um parâmetro do ecossistema que descreve a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

No ambiente aquático, dois grupos de animais são predominantemente utilizados como bioindicadores de contaminação: peixes e moluscos bivalves, devido a seus mecanismos de bioacumulação e biomagnificação. Os peixes podem ser encontrados praticamente em

todo o ambiente aquático e desempenham um papel ecológico importante na cadeia trófica (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A sua posição evolutiva em relação a outros vertebrados e a sua capacidade de adaptação a uma grande variedade de ambientes tornam-nos ideais para estudar a evolução e biologia molecular. Uma série de outras características tornam-se excelentes modelos experimentais para estudos em embriologia, neurobiologia, endocrinologia, biologia ambiental e outras áreas (revisado por POWERS, 1989). Por outro lado, os bivalves são amplamente utilizados por apresentarem ampla distribuição geográfica, comportamento sésil e hábito filtrador, que se reflete na bioacumulação de xenobióticos e boa capacidade de resposta (MELWANI et al., 2014).

Nos projetos de biomonitoramento no Brasil a ostra de mangue *Crassostrea gasar* (sin *Crassostrea brasiliiana*, LAZOSKI et al., 2011) tem se destacado, devido a ocorrência natural ao longo do litoral brasileiro (GALVÃO; PEREIRA; HILSDORF, 2013) e seu interesse econômico. A classificação do gênero *Crassostrea* segue a seguinte ordem filogenética: Reino – Animalia; Filo – Mollusca; Classe – Bivalvia; Ordem – Ostreoida; Família – Ostreidae e, por fim, gênero *Crassostrea* (ANGELL, 1986). As ostras *C. brasiliiana* ocorrem em regiões de manguezais, estuarinas ou intra-marés (GALVÃO; PEREIRA; HILSDORF, 2013) e suportam temperaturas entre 16,1 e 26,6°C e salinidades entre 8 e 34,1 ‰ (MENZEL, 1991). Esses organismos podem experimentar impactos antropogênicos diretos e indiretos (ZHANG et al., 2012). A área de habitat sobreposta com atividades potenciais relacionados a exploração, transporte ou uso do petróleo e seus derivados torna a espécie *C. brasiliiana* um organismo modelo importante para o monitoramento. De fato, as ostras têm a capacidade de bioacumular grandes quantidades de compostos tóxicos, o que as torna organismos sentinelas em programas de biomonitoramento (LACROIX et al., 2014).

Os peixes ocupam uma posição de destaque no campo da toxicologia. O entendimento da absorção, comportamento e respostas em peixes expostos a ambientes contaminados apresenta uma alta relevância ecológica. Pode-se avaliar os impactos da contaminação na dinâmica da população, na estrutura de comunidades e na detecção de alterações à nível celular. Essa última abordagem tem tido grandes avanços em que os mecanismos de toxicidade vêm sendo elucidado em peixes-modelos (GIULIO et al., 2008).

O peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido como paulistinha ou peixe zebra oferece diversas vantagens como modelo animal e da biologia do desenvolvimento, pois apresenta fertilização externa, rápido desenvolvimento e transparência de seus embriões. Além

disso, mesmo na ausência total de circulação sanguínea, esses peixes recebem oxigênio por difusão passiva para sobreviver e continuar a desenvolver-se de uma forma relativamente normal durante vários dias, permitindo assim uma análise detalhada de animais com graves defeitos cardiovasculares (GOLDSTONE et al., 2010).

1.3 BIOMARCADORES MOLECULARES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

As respostas biológicas às agressões ambientais podem ser evidenciadas em qualquer nível de organização desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares (WALKER et al., 1996). Uma forma de prever os danos causados pelos xenobióticos nos ecossistemas é por meio da análise das alterações moleculares e bioquímicas. Efeitos nesse nível podem detectar alterações precoces de uma perturbação ambiental antes que ocorram danos irreversíveis nos níveis superiores de organização biológica. Portanto, a utilização de técnicas em níveis moleculares caracteriza-se como preventiva (ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, 2006). Denton e colaboradores (1994) mostraram que os efeitos nos organismos podem ser observados em concentrações bem abaixo daquelas determinadas pelos testes de toxicidade, sugerindo que essas abordagens não são seguras para prever os impactos gerados aos animais aquáticos. Assim, o uso de biomarcadores tem se intensificado como metodologias mais sensíveis e precoces em organismos expostos à contaminantes ambientais. Os biomarcadores são indicadores bioquímicos, celulares, histológicos ou fisiológicos de exposição a xenobióticos (HUGGETT, 1992).

O biomarcador de exposição auxilia na avaliação dos efeitos do xenobiótico ao organismo. Há diversos exemplos de biomarcadores de exposição como: (i) indução de metalotioneínas frente à exposição a metais; (ii) indução do citocromo P450 1A (*CYP1A*) por HPA planares; (iii) vitelogenina por estrogênio. Em geral, procura-se identificar biomarcadores específicos ao referido contaminante. No caso, os genes de *CYP1A* são responsivos a HPA planares, mas também a uma ampla gama de xenobióticos como as bifenilas policloradas (PCB) entre outros. O uso de mais de um biomarcador juntamente com análise química seriam necessários para definir os efeitos da exposição (SCHLENK, 1999).

Em contato com animais aquáticos, os HPA são absorvidos pelas brânquias, pela boca (livremente) ou adsorvidos em alimentos,

atingindo a circulação sanguínea onde são distribuídos pelo organismo. Nesse processo ocorre a absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e eliminação de xenobióticos pelo organismo. Como os HPAs são lipofílicos essa característica garante a passagem através das membranas celulares por difusão passiva. Nas exposições por HPA, essas moléculas são metabolizadas pelo processo de biotransformação de xenobióticos é formado por enzimas de fase I, II e III. Entre as enzimas de fase I, estão as monooxigenases, constituídas, principalmente, pelo sistema citocromo P450 (CYP) e flavina-monooxigenases (FMOs) (NIYOGI et al., 2001) que desempenham papel central na metabolização de xenobióticos lipofílicos, tornando-os hidrofílicos através de reações de detoxificação ou bioativação (OMIECINSKI et al., 2011). Essas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático liso e agem sobre a região de elevada densidade eletrônica ou angular na molécula de HPA (Figura 4). Nas reações de fase II, o composto pode interagir com grupamentos mais hidrofílicos tais como ácido glicurônico, sulfatos, glutationas, entre outros, produzindo um derivado mais solúvel e menos reativo que pode ser excretado rapidamente. Se ele interagir com a glutationa -S-transferase (GST) será produzido um conjugado de Glutaciona (GSH), resultando em produtos mais hidrossolúveis, permitindo que o sistema de transporte de fase III elimine estes conjugados para o meio extracelular. Na fase III, proteínas de membrana, componentes do sistema de resistência a múltiplos xenobióticos (multixenobiotic resistance – MXR), transportam os xenobióticos para o meio extra-celular (LUCKENBACH; EPEL, 2008), os quais são eliminados através da urina na forma de tioésteres (NETTO et al., 1999).

No ambiente intracelular os HPA podem interagir com fatores de transcrição chamados receptor de hidrocarboneto de arila (AhR) localizados no citosol (Figura 7). O AhR encontra-se inativado por chaperonas (HSP90) no citosol. Logo após a ligação do agonista, ocorre heterodimerização do AhR com a proteína translocadora nuclear de receptor de aril hidrocarboneto (ARNT). O heterodímero AHR-ARNT é translocado ao núcleo celular, onde se liga a regiões reguladoras específicas no genoma chamadas de elementos responsivos a dioxinas (DREs), onde diversos genes envolvidos com o metabolismo de xenobióticos são transcritos como as *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* e *UDP-glicoronosil transferase*, entre outros genes (ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, 2006). No citosol, essas proteínas são traduzidas e conduzidas ao retículo endoplasmático (ER), as quais vão desempenhar atividades de monooxigenases do citocromo P450 (CYPs).

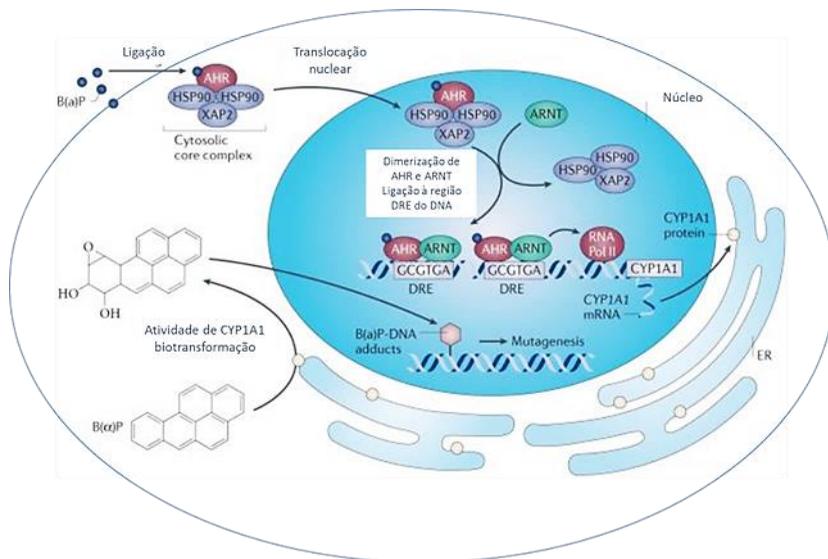


Figura 7. Mecanismo de ativação de genes por HPA. Fonte: adaptado de (LOSSES; LARGER, 2016).

Alguns dos subprodutos gerados pela fase I da biotransformação são espécies reativas de oxigênio (EROS) tais como: o radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). A toxicidade associada à biotransformação de xenobióticos orgânicos está relacionada com a produção de EROS, os quais podem reagir com biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios, gerando processos oxidativos. Em contrapartida, as células possuem um complexo sistema de defesa para se proteger de EROS, o que inclui processos não enzimáticos e principalmente pela atuação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutiona peroxidase (GPX). Exposições de moluscos e peixes à HPA, como benzo(a)pireno, e à PCBs, podem causar alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes (ORBEA et al., 2002). Em bivalves, diferentes parâmetros têm sido utilizados como biomarcadores em programas de biomonitoramento ambiental, como glutiona S-transferases (FITZPATRICK; SHEEHAN; LIVINGSTONEB, 1995), chaperonas (DOMBROWSKI; MARTIN, 2009), teste do cometa (STEINERT, 1999), atividade da acetilcolinesterase e indução de metalotioneínas (LEHTONEN et al., 2006).

Entre as novas perspectivas da toxicologia ambiental está a identificação de novos biomarcadores utilizando metodologias da era pós-genômica (DOWLING; SHEEHAN, 2006; SANCHEZ; RALSTON-HOOPER; SEPÚLVEDA, 2011). A triagem em grande escala proporcionada por abordagens de OMICs (por exemplo, proteômica) pode fornecer uma análise global do perfil de expressão protéica (PEP) em determinada condição celular ou fisiológica (LIU; WANG, 2012; SANCHEZ; RALSTON-HOOPER; SEPÚLVEDA, 2011). Nos bivalves, esta metodologia tem sido adotada em estudos com animais expostos ao petróleo bruto (LISKA et al., 2004; MI; APRAIZ; CRISTOBAL, 2007) esgoto urbano (FLORES-NUNES et al., 2015), nanomateriais (GOMES et al., 2014b), contaminação marinha e metais (LIU; WANG, 2012; MEILLER; BRADLEY, 2002).

Em 2013 cerca de 7361 artigos em proteômica foram publicados no PubMed, sendo 115 com destaque à área de ecotoxicologia que visaram a caracterização de vias de toxicidade, a identificação de biomarcadores e os danos adversos à saúde (GE et al., 2013). Além disso, o projeto europeu de investigação dos Efeitos Biológicos da Poluição Ambiental e Ecossistemas Marinhos (BEEP) publicou em uma edição especial o uso de biomarcadores em organismos marinhos como meio de avaliação da contaminação, sendo que uma das maneiras de investigação incluiu estudos de proteômica com eletroforese em gel bidimensional (géis 2-DE) (PAMPANIN et al., 2006). Verificou-se que nos estudos com proteômica ambiental há o mesmo percentual de publicações utilizando técnicas com géis bidimensionais quanto análises diretas de espectrometria de massas. Isso mostra que a metodologia de eletroforese em gel bidimensional é ainda promissora neste campo de estudo (GE et al., 2013).

1.4 PROTEÔMICA AMBIENTAL

A proteômica pode auxiliar na identificação de novas proteínas biomarcadoras de contaminação ambiental, sem a necessidade de qualquer conhecimento prévio dos mecanismos de ação do xenobiótico (DOWLING; SHEEHAN, 2006; SANCHEZ; RALSTON-HOOPER; SEPÚLVEDA, 2011; WETMORE; MERRICK, 2004).

Manduzio e colaboradores (2005) avaliaram a expressão diferencial de proteínas do mexilhão azul *Mytilus edulis* expostos ao óleo bruto e à água de produção *offshore*. Com a exposição ao óleo foram detectadas 19 proteínas alteradas, porém somente cinco foram identificadas, sendo que quatro delas mostraram expressão reprimida

(actina, tropomiosina, frutose bisfosfato aldolase, malato desidrogenase), enquanto uma proteína delas foi super-expressa, a proteína ligantes a metal pesado (MANDUZIO et al., 2005).

Ensaio *in vitro* com exposição por arsênico mostraram diversas proteínas alteradas utilizando a técnica de 2-DE acoplada a espectrometria de massas: alfa-enolase, HSP90B, piruvato quinase, aldolase redutase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), SOD e tioredoxina; filamentos intermediários, citoqueratinas 14 e 8. Peixes curimatá, *Prochilodus scrofa*, tratados com 3 metilcloranteno (3-MC) apresentaram alteração nas isoenzimas do sistema microsomal P450 hepáticos como CYP1A1 e CYP1A3 (GE et al., 2013).

Atualmente as pesquisas com proteômica têm focado em duas áreas principais: proteômica de expressão, a qual quantifica os níveis de proteínas em determinadas condições e a proteômica funcional, caracterizada por separar proteínas oriundas de organelas e complexos (DUCLOS; DESJARDINS, 2011). A proteômica de expressão envolve a investigação de proteínas alteradas em um estado, por fármaco ou molécula na busca de diagnósticos e alvos terapêuticos (SHEVCHENKO; VALCU; JUNQUEIRA, 2009). Entretanto, proteomas totais não são representativos de todas as proteínas contidas em uma célula, pois, proteínas de baixo peso molecular são difíceis de serem identificadas. Uma técnica comumente utilizada para contornar essa situação é o isolamento de compartimentos subcelulares. Utilizando os métodos de centrifugação diferencial, frações enriquecidas de diferentes organelas podem ser isoladas e resolvidas por proteômica. Este método é particularmente útil na investigação de organelas específicas que são afetadas pela exposição à contaminantes (DUCLOS; DESJARDINS, 2011), e também em condições patológicas (WONG; ADELI, 2009).

O proteoma de compartimentos subcelulares tem muitas vantagens em relação às abordagens tradicionais usando células inteiras, porque permite uma análise mais detalhada de uma organela particular e suas funções biológicas correspondentes (JUNG, 2000; WONG; ADELI, 2009).

Os microsomas consistem em um conjunto de membranas contínuas às quais incluem o retículo endoplasmático rugoso e liso, porção de retículo endoplasmático com complexo de Golgi (RE-GOLGi), complexo intermediário (RECG) e pelo complexo de Golgi (CG). O tráfego de proteínas e lipídeos nos microsomas é mediado por vesículas que brotam do retículo (WONG; ADELI, 2009). As proteínas que constituem o sistema microsomal endoplasmático e fusionam-se ao lado *cis* do complexo de Golgi são: citocromo P450 (CYP), citocromo b5 (cit

b5), e a enzima NADPH citocromo P450 redutase (NCR) (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Entretanto, estudos recentes têm revelado a identificação de novas proteínas microssomais, bem como proteínas associadas ao complexo de microssomas por meio da técnica de proteômica. Especificamente, 141 proteínas foram identificadas no RE (KNOBLACH et al., 2003), 24 proteínas do RE-CG (BREUZA et al., 2004) e mais de 400 proteínas no CG (WU et al., 2004).

1.5 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR-RT)

Os estudos de transcrição gênica têm sido muito utilizados na identificação de genes, vias e redes subjacentes aos processos celulares e de desenvolvimento (FENG et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa está atualmente realizando estudos, a nível transcricional, para identificar genes alterados por diferentes condições estressantes e desenvolver novas ferramentas de biomarcadores moleculares que possam ajudar a elucidar os mecanismos associados à perturbação do metabolismo causada por xenobióticos em *C. brasiliensis* (LÜCHMANN et al., 2011, 2012, 2015).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR-RT) tem sido amplamente utilizada para a análise da transcrição gênica devido à sua alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e alto rendimento (MORI et al., 2008; YANG et al., 2015). Uma deficiente normalização de dados de transcrição pode causar uma quantificação imprecisa e conclusões incorretas (CHAPMAN; WALDENSTRÖM, 2015). Muitos métodos de normalização de dados estão disponíveis para qRT-PCR (revisão em Liu et al., 2015), mas o mais comumente utilizado baseia-se na normalização com genes de referência que apresentem uma transcrição estável entre as condições testadas. Entretanto, vários relatos destacam algumas dificuldades na identificação de um gene normalizador na análise de qRT-PCR devido à variabilidade inerente do padrão de transcrição gênica em diferentes tecidos, gênero (FILBY; TYLER, 2007) e no desenvolvimento (TANG et al., 2007). Portanto, a seleção de genes normalizadores de referência é crítica para a precisão da análise de qRT-PCR (CHAPMAN; WALDENSTRÖM, 2015; LIU et al., 2015). Várias metodologias têm sido utilizadas para avaliar a estabilidade dos dados de transcrição de genes de modo a auxiliar na seleção de um gene normalizador ideal. Os métodos mais empregados utilizam os *softwares* (VANDESOMPELE et al., 2002a), NormFinder (ANDERSEN; LEDET-JENSEN; ORNTOFT, 2004), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), delta Ct (ΔCt) (SILVER et al., 2006) e RefFinder (XIE et al., 2012).

1.6 OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

O objetivo desta tese foi investigar e avaliar respostas bioquímicas e/ou moleculares de *C. brasiliiana* e *D. rerio* frente à exposição a diferentes xenobióticos com o intuito de identificar novos biomarcadores de contaminação, bem como auxiliar na elucidação de alguns mecanismos celulares e moleculares envolvidos na toxicidade. Sendo assim, três contaminantes ambientais foram escolhidos: fração de óleo diesel acomodada em água, representante de uma mistura complexa de hidrocarbonetos; exposição a fenantreno em diferentes temperaturas e/ou salinidades, e por fim, 6-hidroxicriseno representando um HPA fotooxidado que pode ocorrer no ambiente.

Os capítulos desta tese foram separados de acordo com o desenho experimental, metodologia, resultados e discussões realizados com base nos objetivos propostos para cada projeto.

O Capítulo 1 apresenta a introdução geral da tese. O estudo apresentado no Capítulo 2 contém uma lista de proteínas microssomais expressas em *C. brasiliiana* tratadas com 10% FAD, constituindo um perfil de proteínas diferencialmente expressas, que potencialmente, podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição, bem como, contribuir para desvendar as respostas moleculares associadas à exposição à FAD no retículo endoplasmático. Essas análises foram conduzidas em brânquia de ostras expostas por 24h e 72h a FAD.

O Capítulo 3 aborda a seleção de genes normalizadores para análise transcricional por PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT). Os resultados são provenientes da análise de quatro *softwares* comumente utilizados na seleção de genes normalizadores. Os nove genes de referência foram analisados em três diferentes condições experimentais: (i) exposição a 10% FAD; (ii) exposição à fenantreno, combinado com diferentes temperaturas e (iii) exposição à fenantreno, combinado com diferentes salinidades.

O Capítulo 4 compreende os resultados obtidos em estudos sobre os efeitos do HPA fotooxidado, 6-hidrocriseno, sobre o desenvolvimento de *Danio rerio*, utilizado como animal modelo. Nesse projeto, foram avaliados parâmetros de mortalidade e sobrevivência, além de parâmetros moleculares nos animais nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário-larval.

O Capítulo 5 contém o resumo das principais conclusões dos Capítulos 2, 3, 4, bem como destaca as considerações finais deste estudo.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS MICROSSOMAS DE *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS À FRAÇÃO DE ÓLEO DIESEL ACOMODADA EM ÁGUA (FAD)

Gabrielle do Amaral e Silva Müller^a; Karim Hahn Luchmann^b; Guilherme Toledo-Silva^a; Maria Risoleta Freire Marques^a; Afonso Celso Dias Bainy^{a*}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brasil

^b Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade do Estado de Santa Catarina, Laguna 88790-000, Brasil

***Corresponding Author:**

Afonso C.D. Bainy, E-mail address: afonso.bainy@ufsc.br; Telephone number: + 55 48 3721 6391

O tratamento dos animais realizado neste capítulo é parte integrante da tese de doutorado de Karim Hahn Luchmann (PPGBQA/UFSC).

ABSTRACT

Microsomes are the most active cell membranous structure involved in the synthesis, sorting and secretion of proteins. Moreover, microsomes play a vital role in the detoxification of many endogenous and xenobiotics compounds. Besides inducing morphological and functional changes in reticulum endoplasmic (ER), little is known about the mechanisms by which petroleum by-products can inflict microsomal toxicity in oysters. The aim of this study was to investigate changes in protein expression profiles (PEP) of microsomal-enriched fractions from gills of oysters *Crassostrea brasiliiana* (= *C. gasar*) exposed to 10% of diesel fuel water-accommodated fraction (FAD) for 24 and 72 h hours. Results show that FAD exposure induced major changes in the protein expression profile in the time-course exposure at 24 and 72h, as shown by the number of induced proteins. Overall, thirteen proteins were found to be up-regulated, whereas other sixteen were down-regulated. Distinctive sets of differentially- expressed proteins were found in 24h and 72h, suggesting different time-dependent mechanisms involved upon exposure to FAD. Eleven differentially-expressed proteins were identified by MALDI-TOF and/or MALDI-TOF-TOF. Among them, 7 were ER related, including: phagosome ER-mediated (α -tubulin, β -tubulin and 14-3-3 proteina zeta), protein processing in ER (thioredoxin domain-containing protein), whereas four others were related to distinct processes, such as: xenobiotic and lipid metabolism (cytochrome P450 6A and NADPH-cytochrome P450 reductase), ubiquitin pathway mediated proteolysis (E3 Ubiquitin-protein ligase MIB2) and energetic metabolism (beta-1,3-galactosyltransferase 1). The proteomics analysis in this study provided additional knowledge of FAD effects in gill microsomes at the protein level. The microsomal protein pattern (PEP) reported here, after confirmation and validation, can be used as putative new biomarker in ecotoxicological studies and environmental biomonitoring.

Keywords: diesel oil, toxicoproteomics, microsomes, *Crassostrea brasiliiana*.

RESUMO

Os microsossomas consistem em um conjunto de membranas contínuas às quais incluem o retículo endoplasmático rugoso e liso, e, complexo de Golgi (CG) e desempenham um papel vital na desintoxicação de muitos compostos endógenos e xenobióticos bem como na síntese, triagem e secreção de proteínas. Além de induzir alterações morfológicas e funcionais no RE, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais os subprodutos de petróleo podem infligir toxicidade microsossomal em ostras. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações nos perfis de expressão protéica (PEP) de microsossomos de brânquias de ostras *Crassostrea brasiliiana* (= *C. gasar*), expostas à fração de óleo diesel acomodada em água 10% (FAD 10%) durante 24 e 72 h. Os resultados mostram alterações no perfil de proteínas expressas em função da exposição a FAD por 24 e 72h. Um conjunto de onze proteínas com expressão diferencial foram identificadas por MALDI-TOF e / ou MALDI-TOF-TOF. Entre estas, sete mostraram-se relacionadas com o RE, incluindo: fagossomo mediado por ER (α -tubulina, β -tubulina e 14-3-3 proteína zeta), processamento de proteínas em ER (proteína com domínio de tiorredoxina), enquanto outras foram relacionadas a processos distintos, como metabolismo de xenobióticos e de lipídeos (citocromo P450 6A, NADPH-citocromo P450 redutase), proteólise (E3 Ubiquitina-proteína ligase MIB2) e metabolismo energético (beta- 1,3-galactosiltransferase 1). A análise proteômica neste estudo forneceu conhecimento adicional sobre os efeitos de FAD em microsossomos de brânquias de *C. brasiliiana* em nível de proteínas. O padrão de expressão de proteínas microsossomais (PEP) aqui relatado, após confirmação e validação, pode ser usado como um conjunto de novos biomarcadores putativos em estudos ecotoxicológicos e no biomonitoramento ambiental.

Palavras-chave: óleo diesel, toxicoproteômica, microsossoma, *Crassostrea brasiliiana*.

2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os ecossistemas costeiros estiveram sujeitos a efeitos tóxicos provocados por derrames de petróleo em nível mundial (BEJARANO et al., 2006; INCARDONA et al., 2014). O óleo diesel é a principal fonte de energia para a indústria, o transporte e demais atividades com fins agrícolas e comerciais, em nível mundial, incluindo o Brasil (BRASIL, 2007, 2012). Devido à demanda excessiva, vários acidentes estão relacionados à exploração, produção e transporte de petróleo, impactando particularmente os ecossistemas costeiros e levando a exposição de organismos aos compostos petroquímicos (GOLSTEIN et al., 2011; SIMONATO et al., 2008). Há, portanto, uma necessidade urgente de previsão e avaliação dos efeitos do petróleo bruto e seus subprodutos nos organismos aquáticos para a realização de estudos de avaliação de risco.

Estudos de biomonitoramento geralmente envolvem análise química de água e medição de biomarcadores bioquímicos em organismos expostos. Contudo, estes parâmetros são insuficientes para avaliar os efeitos celulares contra produtos petrolíferos (ARUKWE et al., 2008). Além disso, os parâmetros de monitoramento utilizam um pequeno número de biomarcadores com base na Toxicologia Humana e apresentam-se limitados para estudos com moluscos (FORBES; PALMQVIST; BACH, 2006). Entender a biologia dos bivalves e a sua susceptibilidade aos poluentes tornou-se uma questão importante para o desenvolvimento de ferramentas mais sensíveis para o diagnóstico da qualidade ambiental, além dos métodos analíticos tradicionais (CAJARAVILLE et al., 2000; GOMES et al., 2014). Neste contexto, a procura de novos biomarcadores em diferentes condições ambientais está entre os horizontes da toxicologia ambiental na era pós-genômica (DOWLING; SHEEHAN, 2006; GE et al., 2013; SANCHEZ; RALSTON-HOOPER; SEPÚLVEDA, 2011). Assim, a triagem em grande escala proporcionada por abordagens de OMICs (por exemplo, a proteômica) permite a realização de uma análise global de proteínas expressas, as quais podem fornecer padrões de expressão protéica (PEP) determinados, superando as desvantagens tradicionais de biomarcadores de parâmetro único (LIU; WANG, 2012). Nos bivalves, esta metodologia tem sido explorada em exposição ao petróleo bruto (MI; APRAIZ; CRISTOBAL, 2007), esgoto urbano (FLORES-NUNES et al., 2015), nanomateriais (GOMES et al., 2014a), poluição marinha e metais (LIU; WANG, 2012; MEILLER; BRADLEY, 2002).

O proteoma de compartimentos subcelulares tem muitas vantagens em relação às abordagens tradicionais que utilizam células inteiras, uma vez que permite mais detalhamento da análise do proteoma de uma organela particular e de suas funções biológicas correspondentes (JUNG, 2000; WONG; ADELI, 2009). Microsomas são estruturas de membranas consideradas bastante ativas, estando envolvidas na síntese, classificação e secreção de proteínas, desempenhando, ainda, um papel vital na desintoxicação de muitos compostos endógenos e xenobióticos (WONG; ADELI, 2009). Os microsomas são derivados principalmente do retículo endoplasmático (RE) e são alvos ideais para investigar o metabolismo de compostos, as funções enzimáticas ligadas à membrana, as interações lipídeo-proteínas, e as interações medicamentosas (PENG et al., 2012). Entre as respostas celulares de organismos à contaminação ambiental, análises subcelulares mostraram que o óleo pode induzir mudanças morfológicas e funcionais no RE (BACH; BAKER, 1991). Alguns estudos mostraram alterações de proteínas no conteúdo microsomal na presença de compostos orgânicos (JONSSON et al., 2006a) e dióxido de silício (TANANOVA et al., 2014). Outro estudo utilizou perfis de expressão proteica peroxisomal (PEP), associados à exposição a poluentes marinhos, como uma ferramenta para a descoberta de biomarcadores (MI et al., 2005) e poluentes na avaliação de risco no ambiente marinho (MI et al., 2005; MI; APRAIZ; CRISTOBAL, 2007).

Devido à natureza altamente responsiva aos contaminantes ambientais, têm-se enfatizado a utilização dos bivalves como biomonitores de águas costeiras em todo o mundo há mais de 30 anos (MELWANI et al., 2014). Esta característica resulta da sua capacidade de bioacumulação e concentração de poluentes orgânicos, hábito de filtração na alimentação, além de serem sedentários, abundantes e apresentarem ampla distribuição geográfica. Neste contexto, a ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* (= *Crassostrea gasar*, LAZOSKI et al., 2011) ocorre naturalmente ao longo de todo o litoral brasileiro (GALVÃO; PEREIRA; HILSDORF, 2013). Devido a essa ampla distribuição, as ostras estão sujeitas a uma vasta gama de influências antropogênicas, diretas e indiretas (ZHANG et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar alterações nos perfis de expressão proteica (PEP) de frações microsomais enriquecidas, obtidas a partir de amostras de brânquias de ostras *C. brasiliana* expostas, em concentrações subletais, a 10% FAD (fração de óleo diesel acomodada em água), por 24h e 72h. Os resultados identificaram um conjunto de proteínas expressas diferencialmente, associadas às funções do RE e à outras vias metabólicas, permitindo novos *insights* sobre a toxicidade do

petróleo em microsomas de ostras, não relatados anteriormente. As proteínas que compõem os PEP podem contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares associados à exposição à FAD no RE, bem como, podem vir a ser utilizadas como biomarcadores de exposição à FAD em bivalves.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo identificar alterações no perfil de proteínas microssomais em brânquias da ostra *C. brasiliana* frente à exposição a 10% da fração de óleo diesel acomodada em água (FAD), a fim de contribuir para o delineamento do conjunto de respostas moleculares no retículo endoplasmático, associadas à exposição por uma mistura complexa de hidrocarbonetos.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil diferencial de proteínas expressas no microsossoma de brânquias de ostras *C. brasiliana* expostas à 10% de FAD durante 24h e 72h;
- Identificar as proteínas expressas diferencialmente, visando relacioná-las com respostas moleculares e/ou vias metabólicas determinadas associadas à exposição à FAD no retículo endoplasmático de *C. brasiliana*;
- Propor alvos proteicos como biomarcadores moleculares a serem, potencialmente, utilizados como ferramentas para o monitoramento de ambientes contaminados com óleo diesel e/ou derivados de petróleo;

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Ostras do mangue adultas, *C. brasiliiana*, com comprimento de concha similares (4.0 ± 1.0 cm) foram obtidas no cultivo experimental de ostras na praia do Sambaqui (Laboratório de Moluscos Marinhos - LMM, UFSC), localizado na cidade de Florianópolis, SC, região sul do Brasil. Após a coleta, os animais foram imediatamente transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica - LABCAI, UFSC. As ostras foram transferidas para aquários de 40 L com água do mar filtrada a $0,45 \mu\text{m}$ (um animal por 1 L de água do mar) e mantidas sob aeração constante, a temperatura de 21°C e salinidade a 25 ppt. As ostras foram alimentadas com microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana* duas vezes por dia, nas densidades de $3,3 \times 10^6$ células mL^{-1} e $2,2 \times 10^6$ células mL^{-1} , respectivamente. A água foi trocada diariamente durante o período de aclimação por uma semana antes das exposições.

2.3.2 Preparação de FAD e condições experimentais

A fração de óleo diesel acomodada em água (FAD) foi preparada de acordo com Singer e colaboradores (2000), com pequenas modificações (SINGER et al., 2000). Resumidamente, uma parte (1 L) de combustível diesel foi diluída com nove partes (9 L) de água do mar filtrada com $0,45 \mu\text{m}$ (salinidade 25 ppt) num frasco de vidro fechado de 14 L protegido da luz para minimizar a evaporação e degradação dos componentes do combustível. A mistura de diesel-água foi agitada durante 23 h com o homogeneizador de tecido Glas-Col a 1600 rpm a uma temperatura constante de 21°C (Figura 8). Após 1 h, a fase aquosa foi recolhida e transferida para aquários para os experimentos de exposição. A diluição de FAD (10%) foi preparada adicionando a quantidade apropriada da solução de reserva à água do mar filtrada (1:9). A concentração de FAD foi escolhida com base em um estudo prévio em *C. brasiliiana* em que 10% de FAD foi capaz de produzir respostas transcricionais e enzimáticas sem causar letalidade aos animais (LÜCHMANN et al., 2011, 2012).

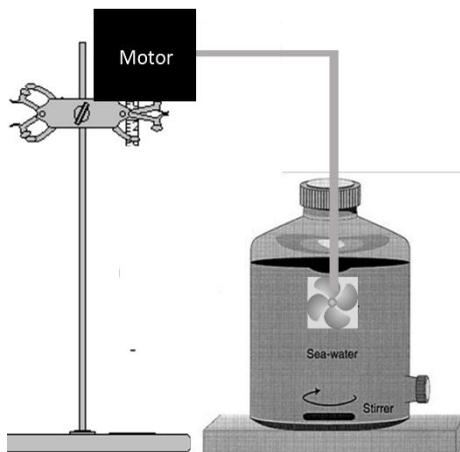


Figura 8. Representação ilustrativa do sistema de preparação da fração de óleo diesel acomodada em água (FAD).

Ao final do período de aclimação, as ostras foram então divididas aleatoriamente em aquários para exposição (um animal por 1 L de água do mar), a qual ocorreu após um período de 24 h sem alimentação. Durante os períodos de exposição, as ostras dos grupos controle e exposto não foram alimentadas para evitar a bioacumulação potencial via alimento. A exposição foi realizada em duplicata (para cada tempo) em aquários com capacidade para 40 litros, com 30 ostras em cada aquário, sob as mesmas condições de temperatura 21.0 ± 2.0 °C, salinidade de 25 ppt, aeração mínima e fotoperíodo, conforme apresentadas anteriormente. Um grupo controle também foi utilizado, no qual os animais foram expostos somente à água do mar. Após cada período de exposição (24 e 72 h), as brânquias de 10 ostras de cada réplica foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, totalizando 20 ostras por grupo experimental, para as análises moleculares e bioquímicas posteriores (Figura 9). Para as análises proteômicas foram reservadas cinco brânquias de cada grupo experimental. Estes procedimentos foram aplicados tanto para os organismos do grupo controle, como do exposto. Os últimos 10 animais de cada aquário foram coletados para as análises químicas.

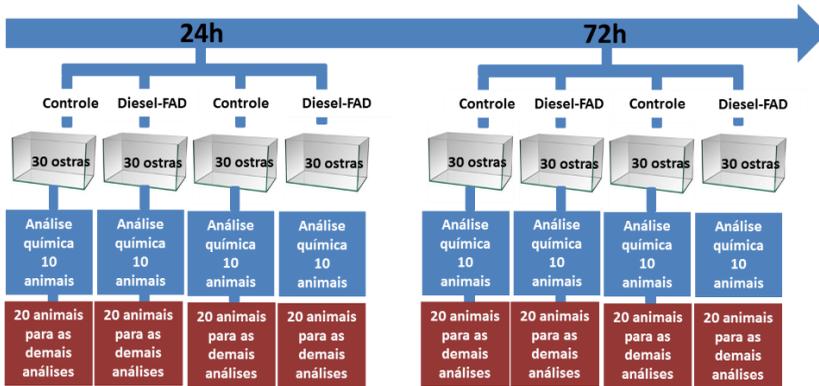


Figura 9. Esquema representativo do experimento de exposição de ostras *C.brasiliana* à FAD por 24h e 72h.

Os níveis de HPA individuais e totais bioacumulados após a exposição a FAD, estão resumidos em (LÜCHMANN et al., 2011), assim como as análises de biomarcadores bioquímicos e moleculares oriundos deste experimento foram publicados nos trabalhos do grupo (LÜCHMANN et al., 2011; LÜCHMANN et al., 2012; LÜCHMANN et al., 2015).

2.3.3 Preparação da amostra

As brânquias de cinco ostras (de cada grupo experimental) foram pesadas individualmente e agrupadas, totalizando 100 mg (*pool*). O *pool* foi homogeneizado na relação 1: 4 (w:v) em tampão gelado (20 mM Tris-HCl pH 7,6 contendo 0,5 M sacarose, 0,15 M KCl, 0,1 mM PMSF e 1µL / mL coquetel inibidor de protease - GeHealthcare), utilizando o homogeneizador de tecido Tecido -Tearor™ (JONSSON et al., 2006a, 2006b). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g durante 20 min a 4°C, seguido de uma segunda centrifugação da fração sobrenadante (S-10) a 100.000 x g durante 1h a 4°C para obtenção da fração microssomal. O conteúdo microssomal foi preparado seguindo dois passos de ultracentrifugação para evitar qualquer contaminação cruzada com outras organelas. Em seguida, o sedimento microssomal foi ressuspensão em tampão gelado (20 mM Tris pH 7,6 contendo 20% glicerol e 0,1 M EDTA) (JONSSON et al., 2006a, 2006b). A

homogeneização e a centrifugação dos grupos controle e expostos foram realizadas simultaneamente. A quantificação das proteínas microssomais foi realizada com 2-D Quant Kit (GE Healthcare) seguindo as instruções descrito pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80 ° C para análise proteômica.

2.3.4 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE)

O procedimento experimental para os géis 2-DE foi feito simultaneamente para ambos os grupos, controle e exposto. A partir de cada pool de brânquias, foram obtidas três extrações de proteínas (triplicata biológica) as quais seguiram para as demais etapas experimentais em duplicata (duplicata técnica) (Figura 10). Um total de 300 µg de proteínas microssomais foram ressuspensas em tampão de reidratação (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 4% (w/v) (3 - [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1 propanosulfonado - CHAPS), 0.5% de anfólitos IPG buffer pH 4-7 (GE Healthcare), 40 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 0.002% (w/v) Azul de bromofenol e 0.5% Triton X-100) (JONSSON et al., 2006, adaptado).

Devido ao grande conteúdo lipídico presente nas membranas microssomais, o qual pode alcançar 49% da fração proteica total (AMAR-COSTESECC et al., 1974), podem ocorrer problemas significativos na solubilização das proteínas nessas amostras (MI et al., 2005). Portanto, para otimizar a resolução de géis 2-DE, foram realizados diversos ajustes metodológicos referentes à extração proteica, solubilização e configuração de parâmetros eletroforéticos. Foram testados três métodos diferentes de extração de proteínas, com base em acetona (GORG, 2004), TCA / acetona (WESTERMEIER & NAVEN 2002, adaptado) e nas condições do 2-DE Clean Up Kit (Ge Healthcare). As proteínas precipitadas com 2-DE Clean Kit foram hidratadas em tiras de IPG (pH 4-7, GE Healthcare) passivamente à temperatura ambiente em aparato IPGphor (GE Healthcare). A focalização isoeétrica (IEF) foi executada no sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare) a 20°C com uma corrente máxima total de 50 µA / tira. O protocolo foi definido da seguinte maneira: Passo-1 100V; Grad-2 500V-500V; Grad-3 8000V- 8000V; Grad-4 8000V-70667V com tensão total de 80767 V / h. Após a IEF, as tiras de IPG foram incubadas com tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2 % (w/v) SDS, 6 M Uréia, 30 % (v/v) Glicerol, 1 % Azul

de bromofenol) por 2 vezes durante 15 min cada. No primeiro passo, foram adicionados 10 mg / ml de DTT, e no segundo passo 25 mg / mL de iodoacetamida. Após a IEF, a separação por massa molecular (segunda dimensão) foi realizada por eletroforese em géis de poliacrilamida (2-DE) 12,5% (p / v), utilizando o sistema Ruby Hoefer SE 600 (GE Healthcare). Os géis foram submetidos à eletroforese vertical a 30 mA / gel, utilizando tampão de eletroforese Tris-Glicina (125 mM Tris base, 0,96 mM Glicina, 0,5 % SDS). A Figura 10 resume como as corridas eletroforéticas foram organizadas a fim de reduzir as variáveis da técnica. Imediatamente após a eletroforese, os géis foram fixados durante 1h (8% de ácido fosfórico e 50% de etanol) e corados utilizando Azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal (Bio-Rad) (5% Coomassie Blue G-250, 20% metanol, 10% sulfato de amônio e 2% ácido fosfórico) durante 48h em agitador, sendo, posteriormente, escaneados ou digitalizados utilizando ImageScanner III (GE Healthcare).

Ao final, foram gerados seis géis (n= 6) por tratamento (24C - controle 24h; 24E -exposto 24h; 72C-controle 72h; 72E - exposto 72h), totalizando 24 géis 2-DE. As imagens dos géis foram exportadas e posteriormente normalizadas com o *software Image Master Platinum v.7.0* (GE Healthcare). Resumidamente, os dados de volume (%) foram normalizados utilizando a fórmula $NVol\% = Ln (vol.\% + 1)$, em que NVol. % representa o percentual de volume normalizado obtido para cada *spot* individualmente. A reprodutibilidade entre as seis repetições (n = 6) foi realizada comparando-se as proteínas em cada condição analisada (*intragroup*) pelo coeficiente de correlação (R^2) do gráfico de dispersão (% de volume versus % de volume). Considerou-se um fator de correlação significativo como sendo maior que 0,7, e como referência o gel controle com maior número de *spots*.

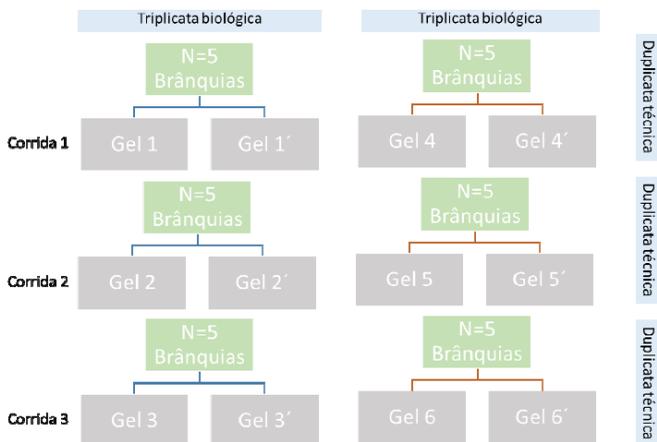


Figura 10. Representação esquemática das eletroforeses para separação das proteínas por massa molecular em géis de poliacrilamida (2-DE). Cada corrida eletroforética foi realizada com quatro géis, sendo dois do grupo controle e dois do grupo exposto do mesmo tratamento (24h ou 72h). Ao final, foram realizadas três corridas eletroforéticas para cada tratamento, sendo 12 géis correspondentes aos animais tratados por 24h (seis géis controle e seis géis exposto) e 12 géis correspondentes aos animais tratados por 72h (seis géis controle e seis géis exposto), totalizando 24 géis bidimensionais.

2.3.5 Análise estatística

As diferenças entre o nível de expressão proteica nas brânquias das ostras dos grupos controle e exposto foram comparadas por meio da análise paramétrica do teste t de *Student*. O nível de significância foi estabelecido em 95%. Os dados foram analisados utilizando o pacote de *software* Statistica 7 (StatSoft) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística foi baseada na presença de proteína em todos os seis géis correspondentes a exposição e condições de controle.

2.3.6 Digestão trípica *in-gel* e espectrometria de massas (MS)

A excisão de *spots* foi realizada manualmente, utilizando ponteiros plásticos, cujas pontas foram previamente cortadas para facilitar a retirada do pedaço do gel correspondente ao *spot* de interesse, como

descrito por SHEVCHENKO et al. (2006) com algumas modificações. As proteínas com alterações equivalentes a 1,0 vez ou mais foram excisadas do gel. Os fragmentos dos géis assim obtidos foram submetidos três etapas de descoloração em solução (50 mM Bicarbonato de amônio e 50% Acetonitrila), sendo posteriormente desidratadas (100% de Acetonitrila). Após secagem, os fragmentos de gel foram reidratados em gelo com solução de tripsina (25 ng / μ L de tripsina *Sequencing Grade Modified* - Promega, 25 mM Bicarbonato de amônio, 10% Acetonitrila). O fragmento de gel reidratado em solução tripsina foi mantido a 37 ° C durante 16 h. Após este período de incubação, os peptídeos tripticos foram extraídos em três etapas com tampão de extração (50 % Acetonitrila e 5 % Ácido trifluoroacético -TFA) durante 30 min. Finalmente, os peptídeos extraídos foram concentrados a vácuo (sistema de vácuo Speedvac® ,Eppendorf) e ressuspensos com 0,1 % TFA. Em seguida, à 1 μ L da solução de peptídeos foi misturado 1 μ L de uma solução saturada de matriz de ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico (5 mg / mL em TFA a 0,1% em Acetonitrila / Metanol 1: 1), sendo 1 μ L da mistura adicionado à placa MALDI, na qual a cristalização ocorreu à temperatura ambiente. A espectrometria de massa (MS) foi realizada no espectrômetro MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros foram adquiridos em modo de refletor linear para MALDI-TOF, método *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) com um modo automatizado e manual, utilizando o *software* Flex Control. Utilizou-se tensão de aceleração de 20 kV e 50 Hz de frequência de laser com tempo de extração de atraso de 140 ns. A calibração interna foi realizada utilizando-se uma mistura de peptídeos contendo sete peptídeos padrão com $[M + H]^+$ íons de Angiotensina II, Angiotensina I, substância P, Bombesina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39 e Somatostatina 28 (Bruker Daltonics). Os espectros das amostras foram obtidos por dados de acumulação de 1000-3000 tiros e analisados pelo *software* FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Após a medição de todas as amostras no modo MS, os peptídeos de intensidade elevada foram selecionados para subsequente fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) e análise em tandem (MS / MS), utilizando o modo LIFT-TOF / TOF (os íons foram acelerados para 8 - 19 kV).

2.3.7 Identificação proteica

A lista de massa experimental derivada dos peptídeos trípticos foi analisada pelo *software* BioTools 2.2 (Bruker Daltonics), seguido de pesquisas em banco de dados, através do MASCOT. Uma base de dados personalizada contendo de sequências proteicas preditas a partir de transcriptoma de *C. brasiliiana* e *Crassostrea gigas* (LÜCHMANN et al., 2015) foi construída internamente visando melhorar a anotação devido à falta de sequências de proteínas de ostras na base de dados MASCOT. A confiança no *match* do perfil de massas de peptídeos (PMF) foi baseada em 95% e pontuação > 40 (*C. gigas*), enquanto que para peptídeos sequenciados por MS/MS foi considerada a pontuação > 27 (*C. gigas*). Foi ainda realizada uma segunda pesquisa junto ao banco de dados de sequências de proteínas não-redundantes de *Crassostrea sp* (taxid: 6564) utilizando o Blastp no NCBI para averiguar a identificação da proteína. Para a correspondência de peptídeos a partir de MS e MS / MS, foi considerado um mínimo de três peptídeos, um máximo de uma clivagem perdida, modificações de peptídeos por carbamidometilcisteína (modificações fixas), metionina oxidada (modificações variáveis) e, ainda, carga peptídica de 1MH +. A tolerância máxima para a correspondência de massa peptídica foi limitada a 200 ppm em modo MS e a 1 Da em MS / MS.

A confiabilidade da identificação foi atribuída a vários critérios como: (i) todas as proteínas possuíam pelo menos uma região de domínio anotada nos seguintes bancos: *Protein Families Database* (PFAM) (FINN et al., 2016), *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART) (SCHULTZ et al., 1998), *Clusters of Orthologous Groups of proteins* (COG) (TATUSOV; KOONIN; LIPMAN, 1997) ou *Conserved Domains and Protein Classification* (CDD) (MARCHLER-BAUER et al., 2015), utilizando configurações de pesquisas padrão no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); (ii) 98% da sequência proteica identificada mostraram homologia com *C. gigas* ou espécie relacionada; (iii) a maioria das proteínas tiveram ao menos um peptídeo sequenciado por MALDI-TOF/TOF; (iv) *e-values* e escores significativos foram considerados para cada proteína putativa em ambos os bancos de dados (MASCOT e NCBI); (v) à maioria das proteínas candidatas a identificação eram atribuídas funções biológicas relacionadas com proteínas microssomais.

2.3.8 Análise funcional no KEEG

Para identificar os processos biológicos associados às proteínas identificadas realizou-se a busca de informação por ontologias de proteínas retiradas da base de dados do *Universal Protein Resource* (UNIPROT) disponível em <<http://www.uniprot.org>> e da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) disponível em <<http://www.genome.jp/kegg/>>. As anotações de proteínas foram obtidas a partir da base de dados *online* UNIPROT, incluindo o nome da entrada, função, atividade catalítica e localização subcelular. Além disso, com intuito de complementar as funções biológicas, encontradas no UNIPROT, utilizou-se a "ferramenta de pesquisa" *on-line* para mapear proteínas-alvo em vias metabólicas por meio do KEGG disponível no endereço eletrônico <http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html>. Por meio dos identificadores de referência do KEGG de *C. gigas* foi possível visualizar a via bioquímica da base de dados KEGG com destaque para as proteínas identificadas e classificadas com base nos seus processos biológicos. A visualização da via foi baseada no serviço de mapeamento de vias fornecido no próprio KEGG. Os números e símbolos da nomenclatura adotada pela Comissão de Enzima (E.C.) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) foram utilizados para representar enzimas.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Alteração no Perfil de Expressão Proteica (PEPs)

Os géis bidimensionais (2-DE) do conteúdo microsomal de brânquias de *C. brasiliensis* expostas à FAD resultaram nos seguintes perfis de expressão de proteínas (PEPs), os quais foram analisados comparativamente: grupo controle 24h comparado ao grupo exposto por 24h e grupo controle 72h comparado ao grupo exposto por 72h (Figuras 11-13). Realizou-se também a comparação entre os grupos exposto 24h e exposto 72h, conforme incluído Anexo 1. Porém, vale ressaltar que a comparação entre os controles 24h e 72h não constam nessa tese.

Aproximadamente, 458 ± 60 proteínas foram detectadas nos géis 2-DE, sendo que 250 proteínas foram combinadas (*match*) nas replicatas dos 24 géis. Os géis 2-DE foram considerados reprodutíveis entre as replicatas de cada tratamento, sendo os valores de dispersão dos *spots* e o coeficiente de variação correspondentes mostrados na Tabela 2. Os ajustes técnicos dos parâmetros de extração e precipitação de proteínas estão resumidos na Figura 14, assim como os parâmetros de focalização isoeétrica estão compilados na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da detecção e comparação (*match*) de cada *spot* nas seis replicatas de géis (2-DE) de cada grupo experimental.

	CV (%)	SD	Inclinação da reta	Coefficiente de correlação (R ²)
24C	17,8	98	0,85	0,90
24E	9,3	56	0,80	0,93
72C	17,0	53	0,94	0,94
72E	4,94	58	0,80	0,91

CV (%) = coeficiente de variação em percentagem;

SD = desvio padrão;

A inclinação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados com base nos desvios padrão a cada dois géis, comparando-se gel exposto como gel de referência de cada grupo experimental, 24 h ou 72 h;

C = controle; E = exposto.

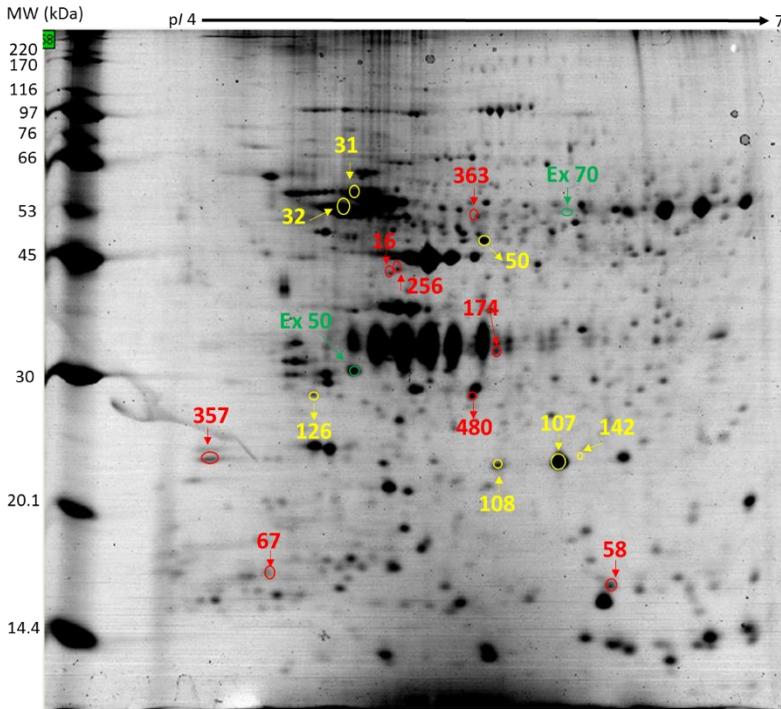


Figura 11. Gel bidimensional (2-DE) representativo contendo as proteínas microssomais de brânquias de *C. brasiliensis* com expressão diferencial $p < 0,05$, conforme a análise comparativa entre grupo controle (C) e grupo exposto (E) e a 10% de fração acomodada em água (FAD), em 24 e 72h de exposição: 24Cx24E e 72Cx72E (Master gel). As massas moleculares (MW) com valores na faixa entre 220 a 14,4 estão indicadas ao lado esquerdo do gel e o gradiente de pH 4-7 está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato total protéico solúvel com 300 μ g foi separado por isoeletrofocalização em *strip* de 13 cm (pH 4-7), a qual foi seguida por eletroforese em gel de poliácridamida 12,5 %, sendo o gel fixado, e, posteriormente, corado com CBB G-250. Os círculos vermelhos representam as proteínas diferencialmente expressas no grupo 24h exposto comparado ao grupo controle 24h; os círculos amarelos representam as proteínas expressas diferencialmente no grupo 72h exposto comparado ao grupo controle 72h ($p < 0,05$, test t de Student).

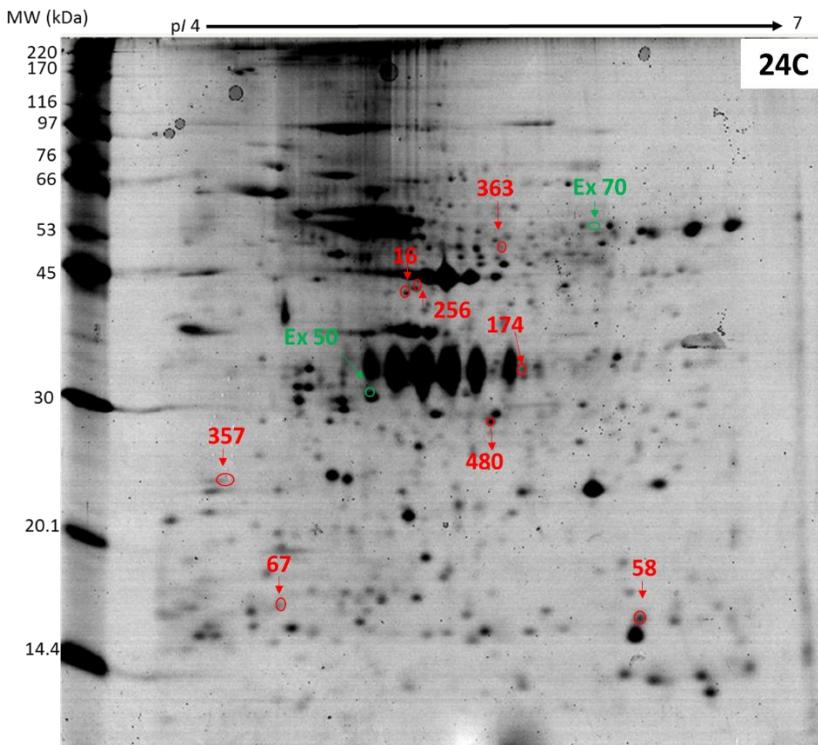


Figura 12. Gel bidimensional (2-DE) representativo contendo as proteínas microsossomais de brânquias de *C. brasiliiana* que apresentaram expressão diferencial ($p < 0,05$) entre os grupos controle 24 h comparados ao grupo exposto a 10% de fração acomodada em água (FAD) por 24h. As massas moleculares (MW) com valores entre 220 a 14,4 kDa estão indicadas ao lado esquerdo do gel e o gradiente de pH utilizado (pH 4-7) está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato protéico total solúvel correspondente a 300 μ g foi separado por isoeletrofocalização em *strip* de 13 cm (pH 4-7) seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. Após a fixação, o gel foi corado com CBB G-250. Os números representam as proteínas diferencialmente expressas no grupo 24h exposto comparado ao grupo controle 24h ($p < 0,05$, test t de Student).

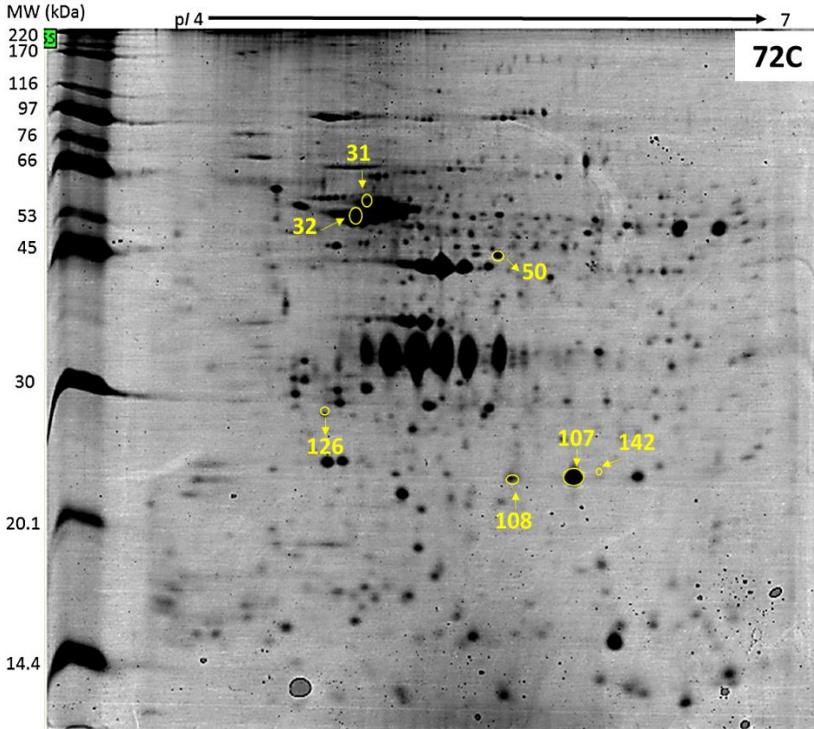
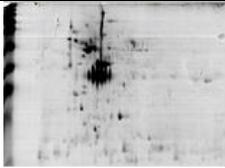
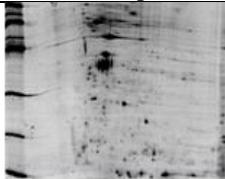
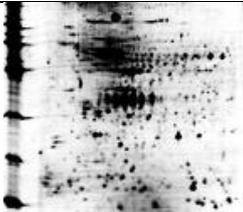


Figura 13. Gel bidimensional (2-DE) representativo, contendo as proteínas microsossomais de brânquias de *C. brasiliiana* que apresentaram expressão diferencial ($p < 0,05$) na análise comparativa entre os grupos controle 72 h e o grupo exposto a 10% de fração acomodada em água (FAD) por 72 h. As massas moleculares (MW), com valores entre 220 a 14,4 kDa, estão indicadas ao lado esquerdo do gel, enquanto o gradiente de pH (pH 4-7) está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato protéico total solúvel correspondente a 300 μg foi separado por isoeletrofocalização em *strip* de 13 cm (pH 4-7), seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. Após fixação, o gel foi corado com CBB G-250. Os números representam as proteínas diferencialmente expressas no grupo 72h exposto comparado ao grupo controle 72h ($p < 0,05$, test t de Student).

Tabela 2. Protocolos testados para separação de proteínas por ponto isoeletrico (IEF).

	Passos	Voltagem Aplicada	Tempo	Função		Referência
1	<i>Step1</i>	500 V	±2h	Eliminação de sais		GÖRG, 2004
	GRAD 2	1000V - 8000 V	±1h30min	Separação das proteínas		
	GRAD 3	8000V – 11300 V	±1h	Separação das proteínas		
	GRAD 4	8000 V – 2900 V	±1h	Separação das proteínas		
	Total	15500 V (50µA/Strip)	9h28 min	Obs. <i>Strip</i> 13 cm, pI 3-10		
					<i>Spots:</i> Disformes; Efeito em espelho;	
2	<i>Step1</i>	500 V	±1h	Eliminação de sais		PENG et al., 2012
	GRAD 2	1000V	±1h	Separação das proteínas		
	GRAD 3	8000V	±1h	Separação das proteínas		
	Total	71551 V 50µA/Strip	10h50 min	Obs. <i>Strip</i> 13 cm, pI 3-10		

3	Step1	100 V	16h00min	Eliminação de sais		WESTERM EIER & NAVEN, 2002, (Adaptado)
	GRAD 2	500V-500 V	±1h	Separação das proteínas		
	GRAD 3	8000V – 8000 V	±1h	Separação das proteínas		
	GRAD 4	8000 V – 70667 V	±8h	Separação das proteínas		
	Total	80767 V 50µA/Strip	26h50 min			
				Obs. <i>Strip</i> 13 cm, pI 4 - 7	<i>Spots:</i> Boa resolução Boa distribuição no gel;	

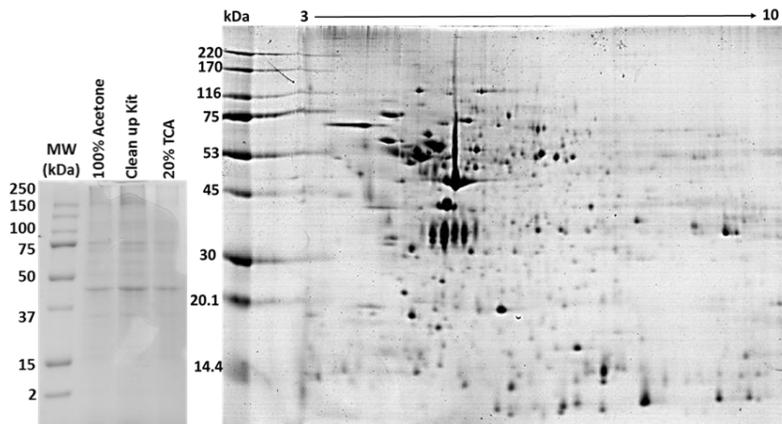


Figura 14. Separação de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), referente a ajustes metodológicos envolvendo a extração proteica e a solubilização das proteínas. **(A)** Gel SDS-PAGE referente a extração e solubilização das proteínas. Três métodos diferentes de extração de proteína foram realizados com base na utilização de 100% acetona (linha 2), 2-DE Clean Up Kit (linha 3) e 20% TCA / acetona (linha 4), e comparados visando a preparação do conteúdo de proteínas microsossomais. A análise comparativa foi baseada no perfil obtido através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10%, no qual foi utilizada a mesma quantidade de proteína (12,5 μ g) para cada um dos homogenatos obtidos. Nota-se a diferença qualitativa e quantitativa do perfil polipeptídico de proteínas microsossomais na faixa entre 30-50 kDa. **(B)** Mapa proteômico representativo obtido após focalização isoeletrica na faixa de pH entre 3-10 (13 cm), seguida por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5%. Os géis foram corados por CBB. Nota-se a sobreposição de *spots* na região 50 - 100 kDa na faixa de *pI* 4 - 7.

Onze foram identificadas com base no perfil de massas e/ou sequenciamento de peptídeos. Todas as informações sobre as proteínas que mostraram alterações significativas nos seus níveis de expressão em microsossoma de ostras expostas a 24 h e 72 h estão em destaque nos mapas proteicos na Figura 11 e Tabela 3. Entre as proteínas expressas diferencialmente, oito foram identificadas em 24 h de exposição à FAD (três induzidas e cinco com expressão reprimida), e sete em 72 h (três induzidas e quatro com expressão reprimida) (Figura 15).

A análise comparativa dos géis 2-DE entre todos os grupos, controle (24h e 72h) e tratados com 10% de FAD (24h e 72h) está apresentada na Figura 15, tendo sido observadas oito proteínas, cuja

expressão foi induzida, e cinco cuja expressão mostrou-se reduzida. As 13 proteínas adicionais estão listadas na Tabela 1 incluída no Anexo 1. Essas estão relacionadas à expressão de proteínas alteradas entre todos os grupos, porém, devido a ausência da comparação entre os grupos controle não foi possível determinar se as diferenças observadas são devido à exposição à FAD e/ ou devido ao período do tempo de exposição, sobretudo ao jejum.

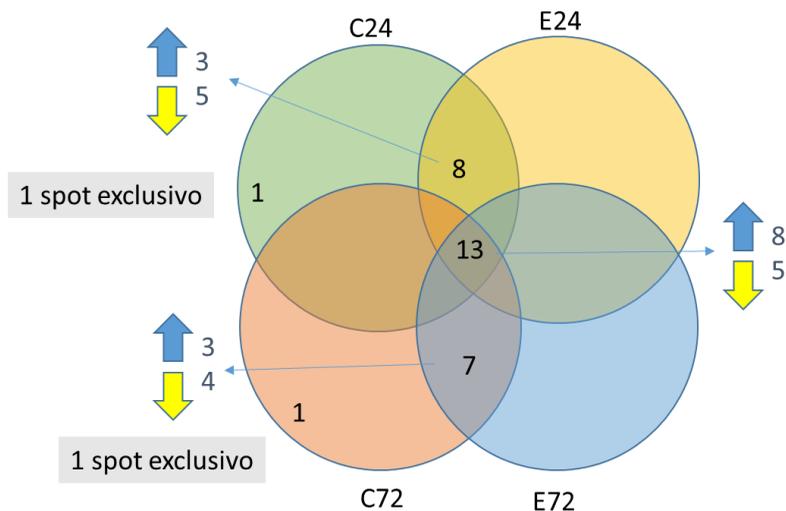


Figura 15. Diagrama de Venn representando o número de proteínas diferenciadamente expresas ($p < 0,05$, teste t de Student) entre os géis 2-DE de microssoma de brânquias de *C. brasiliiana* entre grupos controle (C) (24h e 72h) e grupos expostos (E) a 10% de FAD (24h e 72h). Os dados apresentados de cada grupo experimental (24C, 24E, 72C, 72E) são resultado da análise de seis géis ($N=6$) (triplicatas biológicas e duplicatas técnicas) no programa Image Master Platinum v.7.0 (GE Healthcare). Legenda: Setas azuis representam e proteínas com expressão induzida; Setas amarelas representam proteínas com expressão reprimida; Os retângulos cinzas estão em destaque as proteínas exclusivas em cada tratamento.

De um modo geral, verificou-se que as proteínas identificadas neste estudo apresentaram expressão reprimida frente a exposição à FAD, nos dois tempos de exposição, 24h e 72h, em comparação com o grupo controle (Tabela 3).

Com relação às diferenças qualitativas na expressão de proteínas observaram-se três *spots* exclusivos. Um deles, *spot* nº 50, presente em

todos os seis mapas de repetição de cada grupo exposto a FAD por 24h, foi identificado como sendo actina (Tabela 3, Figura 11). Um *spot* exclusivo foi observado em géis oriundos de 72h de exposição (*spots* n° 70), porém, este *spot* não foi identificado neste estudo.

Um resumo comparativo das alterações no nível de expressão de algumas das proteínas microssomais de brânquias de *C. brasiliانا* após a exposição a 10% FAD esta mostrado na Figura 16, sendo as mesmas associadas a níveis maiores ou menores de expressão, ou seja, expressão induzida e expressão reprimida, respectivamente.

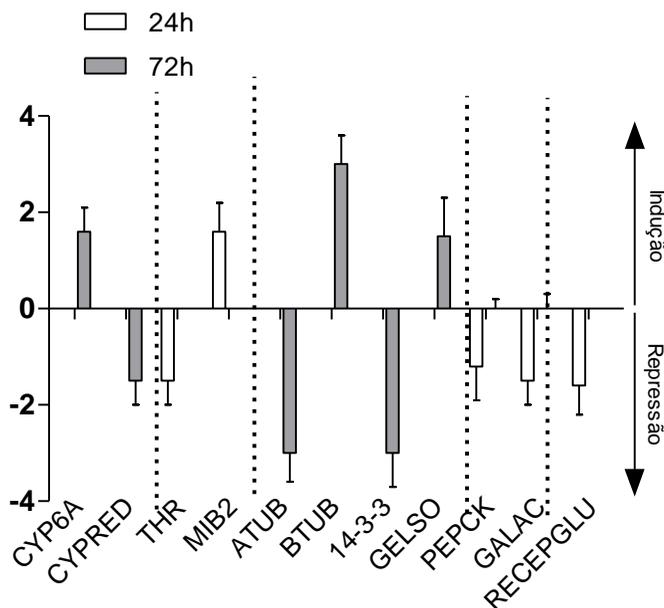


Figura 16. Número de alteração da expressão das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$, test t de Student) identificadas nesse estudo em microsomas de brânquias de *C. brasiliانا* expostas à FAD por 24 e 72h. A quantidade de alterações foi avaliada de acordo com o percentual de volume (% Vol) de proteína comparado entre os grupos controle e exposto das seis replicadas de géis bidimensionais (2-DE) em cada tratamento (N=6). A indução refere-se à maior expressão de uma dada proteína em comparação ao respectivo controle (24h ou 72h), e, de forma análoga, repressão refere-se à diminuição da expressão de uma dada proteína quando comparada ao respectivo controle (24h ou 72h). Proteínas consideradas significativamente alteradas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo programa Image Master Platinum v.7.0. Legenda: Thr-tiorredoxina; MIB2-ubiquitina ligase E3 (MIB2); PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase; GALAC – beta-1,3-galactosyltransferase; CYP6A – citocromo P450 6A;

CYPRED – NADPH citocromo P450 reductase; ATUB- alfa-tubulina; BTUB- beta-tubulina; 14-3-3-proteína zeta; GELSO – Gelsolin; RECEPTOR- receptor de glutamato;

Tabela 3. Proteínas microssomais de *C. brasiliiana*, identificadas por perfil de massas de peptídeos (PMF; MS) e sequenciamento de peptídeos (MS/MS), após exposição a 10% FAD por 24 e 72h.

Nº Spot	Nome da proteína	Espécie e Código de Acesso (UNIPROT)	TE; Nº Vezes	M W/ PI	Mascot Score e-value	BLASTp Identidade E-value	Domínio protéico ^J	Sequência do(s) peptídeo (s)
Identificação com MS ($p>0,05$; Mascot score >59; <i>C. gigas</i>) e MS/MS ($p>0,05$; Mascot score >27; <i>C. gigas</i>)								
31	α -Tubulina	<i>Crassostrea gigas</i> K1PTU5	72h ↓3x	49 5.2	132 2.6e-009	216 2e-70	pfam03953/ pfam00091	R.AVFVDLEPT VVDEV.R.T/ R.FPGQLNADL R.K
32	β -Tubulina	<i>Crassostrea gigas</i> K1QAJ5	72h ↑3x	58 5.0	189 7.5e-16	213 1e-66	pfam03953/ cd02187	K.LAVNMVFPF R.L
142	14-3-3 proteína zeta	<i>Crassostrea gigas</i> K1PHM8	72h ↓3x	24 5.0	65 1.90e-3	8.0e-03	pfam00244/ COG5040	R.YLAEFATGT DR.K
107	Citocromo P450 6A8 (CYP6A)	<i>Drosophila melanogaster</i> Q27593	72h ↑1.6x	25 6.0	49 1.90e+00	32 4e-66	pfam00067/ COG2124	R.FSNLAPLGIP R.R
Identificação com MS ($p>0,05$; Mascot score >59; <i>C. gigas</i>)								
256	Beta-1.3-galactosyltransferase 1	<i>Crassostrea gigas</i> K1PQP1	24h ↓1.5x	53 4.9	68 1.20e-02	75 3e-16	pfam01762/ PLN03133	0
357	Receptor de Glutamato 4	<i>Crassostrea gigas</i> K1QNL6	24h ↓1,6	22 4,2	60 4,20e-02	45 5e-18	CD685	0

16	Tiorredoxina 11 (Thr11)	<i>Crassostrea gigas</i> K1QDC1	24h ↓1,5x	43 5,2	64 4,50e-02	68 9e-10	pfam00085 PTZ00102	0
Identificação com MS ($p > 0,05$ Mascot score < 59)								
67	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)	<i>Gallus gallus</i> P05153	24h ↓1,2x	55 5,6	57 1,90e-01	52 5e-113	PF00821	0
50	Gelsolin-like	<i>Lumbricus terrestres</i> Q8MPM1	72h ↑1.5x	48 5.6	58 1.00e-02	100 3e-45	cd11290	0
363	Ubiquitina ligase E3 (MIB2)	<i>Crassostrea gigas</i> K1Q222	24h ↑1.6x	52 5.5	50 4.70e+00	97 9e-25	pfam06701	0
108	NADPH-- Citocromo P450 redutase (P450 RED)	<i>Crassostrea gigas</i> K1QHU4	72h ↓1,5x	24 6,00	41 4,90e-01	28 5,4e-01	pfam00043	0
174	Glioxilato redutase	<i>Crassostrea gigas</i> K1QLB1	24h ↑2,2x	34 5,79	46 1,00e+00	58 3e-11	pfam02826	0
126	Proteína de ligação ao fator liberador de corticotropina	<i>Crassostrea gigas</i> K1PB66	72h ↓4x	20 5,02	36 3,50e-01	124 1e-36	pfam05428	0
58	Transportador de glicina dependente de sódio e cloreto 2	<i>Crassostrea gigas</i> K1QN64	24h ↑1,5x	15 6,34	36 1,60e+00	83 8e-19	cd11498	0

454	Fatty acyl-CoA reductase 1	<i>Xenopus laevis</i> Q7ZXF5	24h ↓1,6x	28 5,70	33 3,20e+00	97 1e-171	PF07993	0
-----	----------------------------	---------------------------------	--------------	------------	----------------	--------------	---------	---

TE = Tempo de exposição.

2.4.2 Função das proteínas identificadas por KEGG

Para determinar a função proteica de cada uma das proteínas diferencialmente expressas foram utilizadas as anotações referentes ao banco de dados UNIPROT, KEGG e/ou por meio do domínio proteico correspondente. Considerou-se, sobretudo, as proteínas identificadas com valores de pontuação significativos ($MS >40$ e $MS/MS >27$), isto é, sete proteínas. No entanto, foram adicionadas à análise outras três proteínas com baixos valores de pontuação, mas que possuem funções correlatas àquelas com identificação significativa, totalizando, assim, onze proteínas (Tabela 3). Essas proteínas foram associadas a seis classes funcionais: (i) metabolismo lipídico / xenobiótico, (ii) fagossomo mediado pelo retículo endoplasmático (RE), (iii) processamento de proteínas no RE, (iv) degradação de proteínas via ubiquitina, (v), metabolismo energético, (vi) processamento de informação ambiental e transportador de soluto (Figura 17).

Em geral, as funções de sete das 11 proteínas-alvo (64%) são mediadas pelo RE, sendo duas estão relacionadas ao metabolismo energético (18%), e duas relacionadas a outros processos celulares (18%). As vias mediadas pelo RE de algumas proteínas identificadas nesse estudo estão apresentadas na Tabela 4.

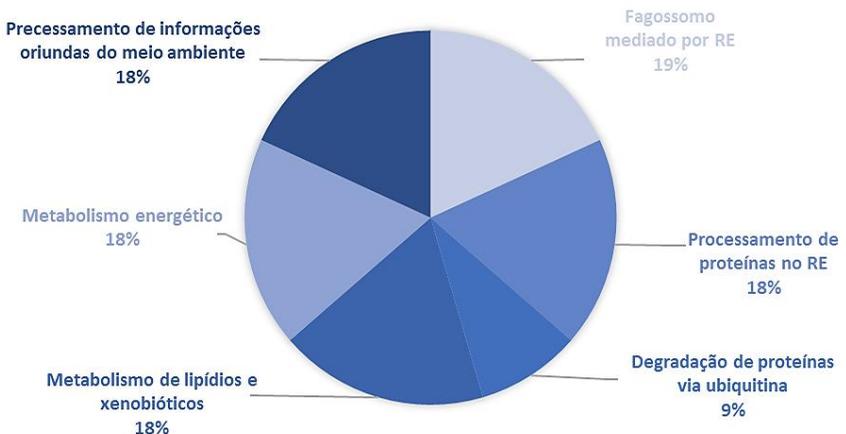


Figura 177. Classificação funcional geral das onze proteínas identificadas, em função de vias/processos celulares, com base nas descrições do KEGG e Uniprot.

Tabela 4. Vias bioquímicas mediadas pelo retículo endoplasmático (RE) de algumas das proteínas de *Crassostrea brasiliana* identificadas nesse estudo.

Via mediada pelo RE	Identificadores das proteínas KEGG/ UNIPROT		Nome da proteína	Organismo	Identificação por MS/MS
A. Fagossomo mediado por RE	crg04145 (Mapa A)	K1R473	Tubulina alpha (TUBA)	<i>Crassostrea gigas</i>	+
		K1RTU5	Tubulina beta (TUBB)		+
B. Processamento de proteínas no RE	crg04141 (Mapa B)	K1QDC1	Tiorredoxina 11 (Thr11)	<i>Crassostrea gigas</i>	-
					-
C. Degradação de proteínas via ubiquitina	Não encontrado	K1Q222	Ubiquitina ligase E3 (MIB2)	<i>Crassostrea gigas</i>	-
D. Metabolismo de lipídeos /xenobióticos		Q27593	Citocromo P450 6A8 (CYP6A)	<i>Crassostrea gigas</i>	+
		K1QHU4	NADPH-- Citocromo P450 redutase		

A.

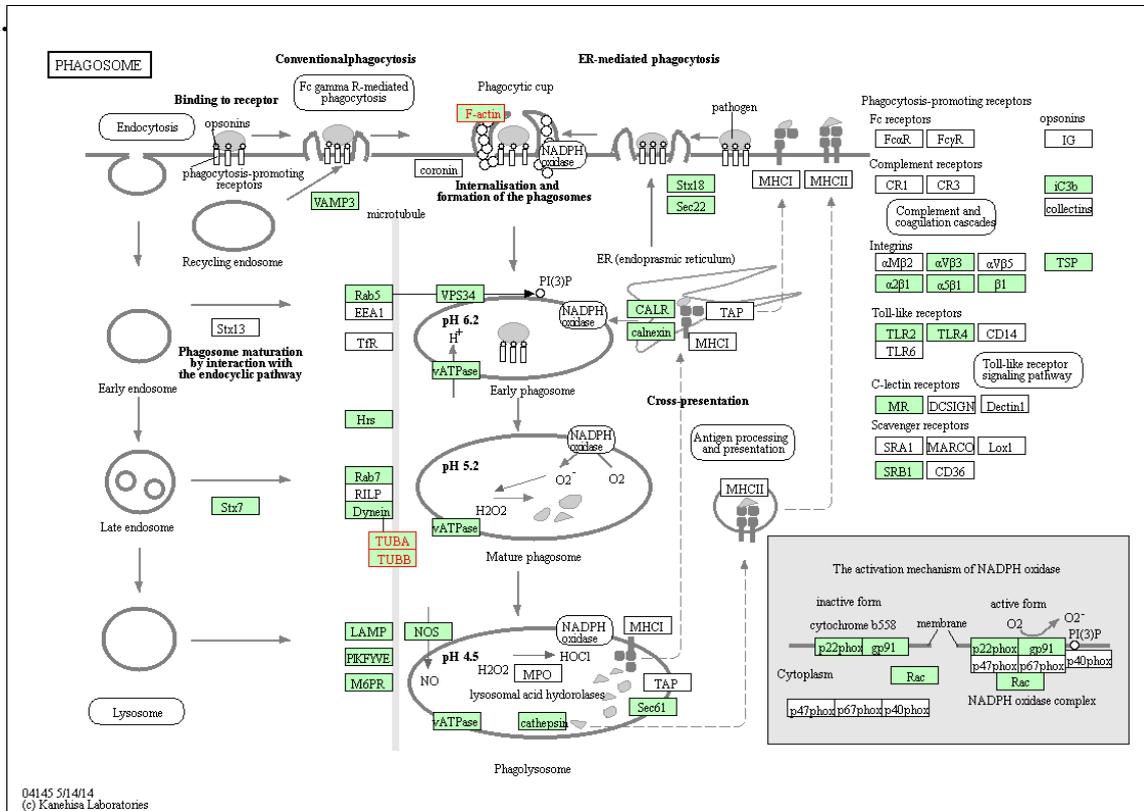


Figura 18. Mapas das vias mediadas pelo retículo endoplasmático (RE) envolvendo duas proteínas identificadas nesse estudo. O mapa gerado pelo KEGG, incorporou as proteínas identificadas (vermelho) em mapas de vias metabólicas do KEEG de *C. gigas* (verde).

A abordagem proteômica é uma ferramenta importante por fornecer uma visão geral das respostas moleculares causadas pelo estresse ambiental, como, por exemplo, a avaliação dos efeitos do óleo diesel em nível proteico. As alterações de proteínas podem ser avaliadas por meio do perfil de expressão de proteínas (PEP) que refletem mudanças na síntese (tradução), ou ainda, na pós-tradução ou degradação de proteínas frente à exposição a poluentes (PASQUEVICH et al., 2013). Até o momento, não há relatos de alterações de proteínas microssomais em bivalves. Portanto, o presente estudo teve como principal objetivo analisar as alterações proteômicas nas brânquias da ostra nativa, *Crassostrea brasiliana*, após exposição à FAD por 24h e 72h, visando a identificação de novos biomarcadores moleculares de exposição ao óleo diesel.

Onze proteínas expressas diferencialmente foram identificadas nas ostras expostas à FAD. Com base na análise do KEGG, as proteínas identificadas foram associadas a seis classes funcionais: (i) metabolismo lipídico/xenobiótico, (ii) fagossomo mediado pelo retículo endoplasmático (RE), (iii) processamento de proteínas no RE, (iv) degradação de proteínas via ubiquitina, (v) metabolismo energético, (vi) processamento de informação ambiental e transportador de soluto (Figura 4). Entre estas proteínas, apenas duas foram identificadas como estando diretamente envolvidas na biotransformação de FAD, ou seja, a proteína citocromo P450 6A8 (CYP6A) e NADPH citocromo P450 redutase (P450 RED). Verificou-se que o nível de expressão do citocromo P450 6A (CYP6A, *spot* nº 107) aumentou (1,6 vezes), enquanto que a proteína NADPH-citocromo P450 redutase (*spot* nº 108) teve sua expressão reduzida (1,5 vezes) após 72 h de exposição (Tabela 3, Figura 11). A principal função da superfamília do citocromo P450 (CYP) é catalisar a conversão metabólica de xenobióticos, promovendo a sua conversão em derivados mais polares que podem ser facilmente excretados pela via de biotransformação por enzimas de fase I de biotransformação ou transportadores de fármacos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Tradicionalmente, membros da superfamília P450, encontrados na fração microssomal, são utilizados como biomarcadores de exposição. Além do tradicional uso da CYP1A como biomarcador em estudos de expressão

gênica e atividade enzimática (EROD) frente à exposição à hidrocarbonetos halogenados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), outras isoenzimas do CYP, como a CYP6A, desempenham um papel chave na bioativação ou metabolização de xenobióticos. Apesar das famílias de CYP6 em invertebrados terrestres demonstraram ter um papel na desintoxicação de xenobióticos e resistência metabólica a inseticidas (CIFUENTES et al., 2012; MUSASIA et al., 2013; SUN et al., 2014), por outro lado, a resposta de CYP6 em invertebrados aquáticos a poluentes ambientais tem sido pouco estudada. Um estudo com invertebrados terrestres mostrou a avaliação da expressão de *CYP6g1* na tolerância à toxicidade de metilmercúrio (MeHg) durante o desenvolvimento de moscas. Este estudo também revelou que este gene é homólogo ao *CYP3A4* em humanos, e, portanto, sugere-se que a indução deste gene pode influenciar a susceptibilidade a MeHg em seres humanos (RAND; LOWE; MAHAPATRA, 2012). Um estudo recente identificou diferentes isoformas de *CYP6* responsivas a exposição por fenol em larvas do mosquito aquático *Chironomus kiinensis*, as quais na sua maioria, mostraram uma variação significativa tanto na atividade enzimática, como na expressão de mRNA correspondente, após a exposição ao fenol (CAO et al., 2016). De maneira semelhante, a indução do gene *CYP6d1* foi observada na exposição à fenobarbital no crustáceo *Daphnia pulex* (KARIMULLINA et al., 2012). No presente estudo, foram observadas alterações significativas na expressão da proteína CYP6A em *C.brasiliana*, após 72h de exposição à FAD sugerindo um possível mecanismo dependente do tempo de exposição ao xenobiótico na família CYP6A.

As proteínas do citoesqueleto apresentaram as maiores alterações nos níveis de expressão nas ostras expostas a FAD. Dois *spots* diferentes, identificados como tubulinas (*spots* n ° 31 e 32), tiveram sua expressão alterada em *C. brasiliana* expostas à FAD, conforme observado no tempo de 72h de exposição (Tabela 3). As tubulinas desempenham um papel essencial em vários processos celulares como o transporte celular, motilidade, divisão celular, posicionamento intracelular de organelas e polimerização do microtúbulos (BADALÀ; NOURI-MAHDAVI; RAOOF, 2008). A fosforilação da tubulina foi descrita como estratégia para prevenir a despolarização da actina e para regular a formação de microtúbulos sob estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2001).

Com base nos dados de MS/Mascot, o *spot* n°50 foi identificado como gelsolina (*spot*), outra componente chave do citoesqueleto. Os níveis de expressão diferencial deste *spot* foi 1,5 vezes maior nas brânquias das ostras expostas ao FAD por 72h. Cabe destacar que a alteração na expressão de proteínas de citoesqueleto pode refletir sua abundância relativa, sua prevalência em bancos de dados ou, ainda, o fato de poderem constituir os principais alvos de estresse oxidativo relacionado a poluentes (RODRÍGUEZ-ORTEGA et al., 2003). As proteínas relacionadas à estrutura e função do citoesqueleto são o primeiro alvo do estresse oxidativo em bivalves, destacando uma ligação direta entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a desregulação do citoesqueleto (MCDONAGH; TYTHER; SHEEHAN, 2005). A actina e a tubulina foram anteriormente implicadas na resposta ao estresse oxidativo (MI; APRAIZ; CRISTOBAL, 2007).

Nos últimos anos foram atribuídas novas funções ao RE ligadas à formação de fagossomos em resposta às partículas na superfície celular. Acredita-se que membranas do RE são recrutadas próximo à superfície celular, onde se fundem com a membrana plasmática e se abrem no local de contato dessas partículas, sendo, assim, responsáveis pelo alongamento dos pseudópodes (DESJARDINS, 2003). Devido à alta densidade do RE, especula-se que a migração do mesmo ocorra provavelmente prendendo-se à rede de microtúbulos actina e tubulina (ROGERS; FOSTER, 2007). Entretanto, o papel exato do RE na fagocitose está longe de ser elucidado em mamíferos (ROGERS; FOSTER, 2007), bem como em invertebrados. De fato, as células epiteliais de brânquias são cercadas por células de defesa, como macrófagos e hemócitos, que podem atuar como efetores imunes e participar dos mecanismos de defesa antimicrobiana em invertebrados (BACHERE et al., 2015). Em geral, o comprometimento da fagocitose é considerado uma resposta imunotóxica, podendo ser afetada por exposição ao óleo e aos HPA e parece ser importante no sistema imune de invertebrados (BARRON, 2012). As alterações na expressão das proteínas actina e tubulina, e/ou suas isoformas, encontradas neste estudo, podem indicar seu possível envolvimento como mediadores da formação do fagossomo via RE, o que sugere uma resposta imunotóxica após exposição ao FAD. Os impactos ecológicos resultantes da imunotoxicidade podem incluir a diminuição da resistência às doenças e

o aumento do parasitismo que podem levar a uma recuperação mais lenta de uma população sujeita a impactos ambientais (BARRON, 2012).

O RE é uma organela multifuncional, que, além de garantir a estrutura correta das proteínas, possui um papel chave na síntese de lipídeos e de esteróis, atuando, ainda, na manutenção do cálcio intracelular (FAGONE; JACKOWSKI, 2009). Desta forma, o RE é sensível a perturbações na homeostase celular que são desencadeadas por diferentes tipos de estresse (KNOBLACH et al., 2003). Essas perturbações podem causar alterações na estrutura das proteínas nascentes, levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, uma condição denominada estresse do RE (FERRARI; SÖLING, 1999). Nas células eucarióticas, essa condição é detectada por diferentes sensores residentes na membrana do RE, os quais desencadeiam uma via de transdução de sinal que induz a expressão de chaperonas e foldases, componentes do sistema de degradação associado ao RE (ERAD), além de aumentar a síntese de fosfolipídios, causando um aumento do volume da organela de forma a contribuir para a recuperação da homeostase. A ativação coordenada dos sensores constitui uma resposta específica ao estresse do RE, a qual foi denominada de resposta a proteínas malformadas ou UPR (*Unfolded Protein Response*) (HUSSAIN; RAMAIAH, 2007; SANO; REED, 2013).

As proteínas não enoveladas adequadamente são retidas no interior do RE. O acúmulo de proteínas nestas condições, sinaliza o recrutamento de chaperonas, que possuem a finalidade de reestabelecer a homeostase celular de proteínas mal enoveladas, tais como *binding protein* (BiP), *heat shock 70 kDa protein 5* (HSPA5), ERp57, calreticulina, calnexina PDI (do inglês, *protein disulfide isomerase*) e p58. As proteínas PDIs contêm o domínio tiorredoxina responsável por catalisar reações redox tiol, podendo atuar na formação de ligações dissulfeto (oxidase), bem como clivar tais ligações (redutase) em proteínas (HIGA et al., 2014; KNOBLACH et al., 2003). Devido ao seu papel essencial no estresse do RE, a proteína PDIA3 foi selecionada como biomarcador de estresse celular para tratamento da fibrose hepática em ratos (ZHANG et al., 2016). Um estudo anterior mostrou que a expressão gênica de PDIA3 foi encontrada super-expressa no fígado do salmão do Atlântico submetido a hiperoóxia crônica, a qual mostrou-se como redox-sensível na resposta adaptativa de células ao estresse oxidativo (HUANG

et al., 2009). Outro estudo mostrou que a PDIA5 contribuiu para o rearranjo de ligações dissulfeto sob condições de estresse, conduzindo assim à ativação de genes-alvo relacionados com a quimio-resistência em células cancerosas (HIGA et al., 2014). No presente estudo, entre as proteínas relacionadas com a resposta ao estresse no RE, foi identificada a repressão da proteína tioredoxina após 24h de exposição à FAD (*spot* nº 65, Tabela 3). A repressão da expressão da tioredoxina pode indicar que provavelmente o estresse do RE esteja apenas no início, sendo necessário um intervalo de tempo maior para a sua ativação. A indução posterior da proteína tioredoxina neste estudo poderia ser um indicativo da restauração do enovelamento proteico, através do rearranjo das ligações dissulfeto, como uma tentativa de restaurar a homeostase no RE frente à exposição à FAD. Estudos anteriores mostraram que a exposição à FAD não foi capaz de produzir alterações significativas nas enzimas antioxidantes GPX, GR, G6PDH, GST e SOD em brânquias de *C. brasiliensis* (LÜCHMANN et al., 2011). Essas enzimas podem atuar com o intuito de eliminar as EROS geradas pelo contaminante, mas também, as alterações da atividade dessas enzimas representam uma importante adaptação ao estresse induzido por poluentes.

O RE também desempenha um papel vital no controle da qualidade de proteínas celulares, através da remoção e degradação de proteínas que não estão corretamente enoveladas em complexos ativos (BUCHBERGER; SCHINDELIN; HÄNZELMANN, 2015; TSAI; WEISSMAN, 2010). Este processo é conhecido como degradação de proteínas por ER (ERAD) que garante que apenas as proteínas corretamente enoveladas sejam transportadas para seus destinos finais (KLEIZEN; BRAAKMAN, 2004; TSAI; WEISSMAN, 2010). O processo de ERAD se inicia quando chaperonas reconhecem proteínas mal enoveladas, sinalizadas pela manosidase I, e as direcionam para sítios específicos na membrana do RE, onde são transportadas, através da membrana, do lúmen desta organela para o citoplasma. A ubiquitina ligase E3 está associada à membrana do RE onde catalisa a polimerização de cadeias de ubiquitina, às quais são adicionadas ao substrato a ser degradado (YE et al., 2004). Isto permite que o substrato seja retirado da membrana do RE pela ATPase citosólica p97/VCP, que em conjunto com cofatores, direciona o substrato para 26S proteossoma, onde é, então, degradado (MEUSSER et al., 2005; VEMBAR; BRODSKY, 2009). A

modificação covalente de proteínas com adição de moléculas de ubiquitina (denominada "ubiquitinação") regula diversos processos essenciais nas células eucarióticas, controlando essencialmente a degradação de proteínas. No presente trabalho, foi observada a indução da expressão da ubiquitina ligase E3 (1,6 vezes) após 24h de exposição a FAD (Tabela 3). A regulação da expressão desta proteína provavelmente está ligada a condições tanto temporais, quanto espaciais, entretanto há ainda pouca compreensão desta dinâmica em nível molecular (BUCHBERGER; SCHINDELIN; HÄNZELMANN, 2015). No entanto, poder-se-ia especular que a alteração significativa observada na expressão desta proteína seja causada por um aumento de proteínas mal enoveladas em decorrência da exposição à FAD, as quais estariam sendo conduzidas para o proteossoma 26S para posterior degradação.

Em resumo, postulamos que a indução do CYP6A ocorra durante a biotransformação dos componentes do FAD. A proteína NADPH citocromo P450 redutase atua na transferência de elétrons restaurando o estado redox do CYP6A, aparentemente de forma tempo-depende (72 h). O processo de biotransformação assim desencadeado gera a formação de EROS, causando estresse oxidativo. O estresse oxidativo provoca um aumento na quantidade de proteínas mal enoveladas no RE, estabelecendo, assim, uma condição conhecida como estresse do RE, a qual pode desencadear uma resposta orquestrada por chaperonas para recuperação da função microsomal. Por outro lado, alterações significativas nos níveis de expressão das proteínas tioredoxina e ubiquitina ligase E3 atuam para reduzir o número de proteínas mal enoveladas no RE e restabelecer a homeostase em contraponto ao estresse no RE, o que já ocorre após 24h de exposição a FAD. Verificou-se também as alterações relacionadas com proteínas de citoesqueleto no microsoma de brânquias de *C. brasiliensis* em 72h de exposição a FAD, o que poderia estar refletindo um incremento da resposta fagocítica, e, conseqüentemente, um aumento da imunotoxicidade, e, ainda, alteração no movimento vesicular por actinas e tubulinas. Além disso, a este quadro poderia estar associado que um aumento do estresse oxidativo relacionado com o incremento de alterações pós-traducionais em proteínas do citoesqueleto. Em suma, as alterações de proteínas encontradas neste estudo em resposta à exposição a FAD revelaram um conjunto de respostas moleculares interessantes decorrente de sua toxicidade; conjunto este envolvendo o enovelamento, processamento e degradação de proteínas no RE, entre outros processos relacionados à

90
dinâmica desta estrutura celular, conforme representado
esquemáticamente na Figura 19.

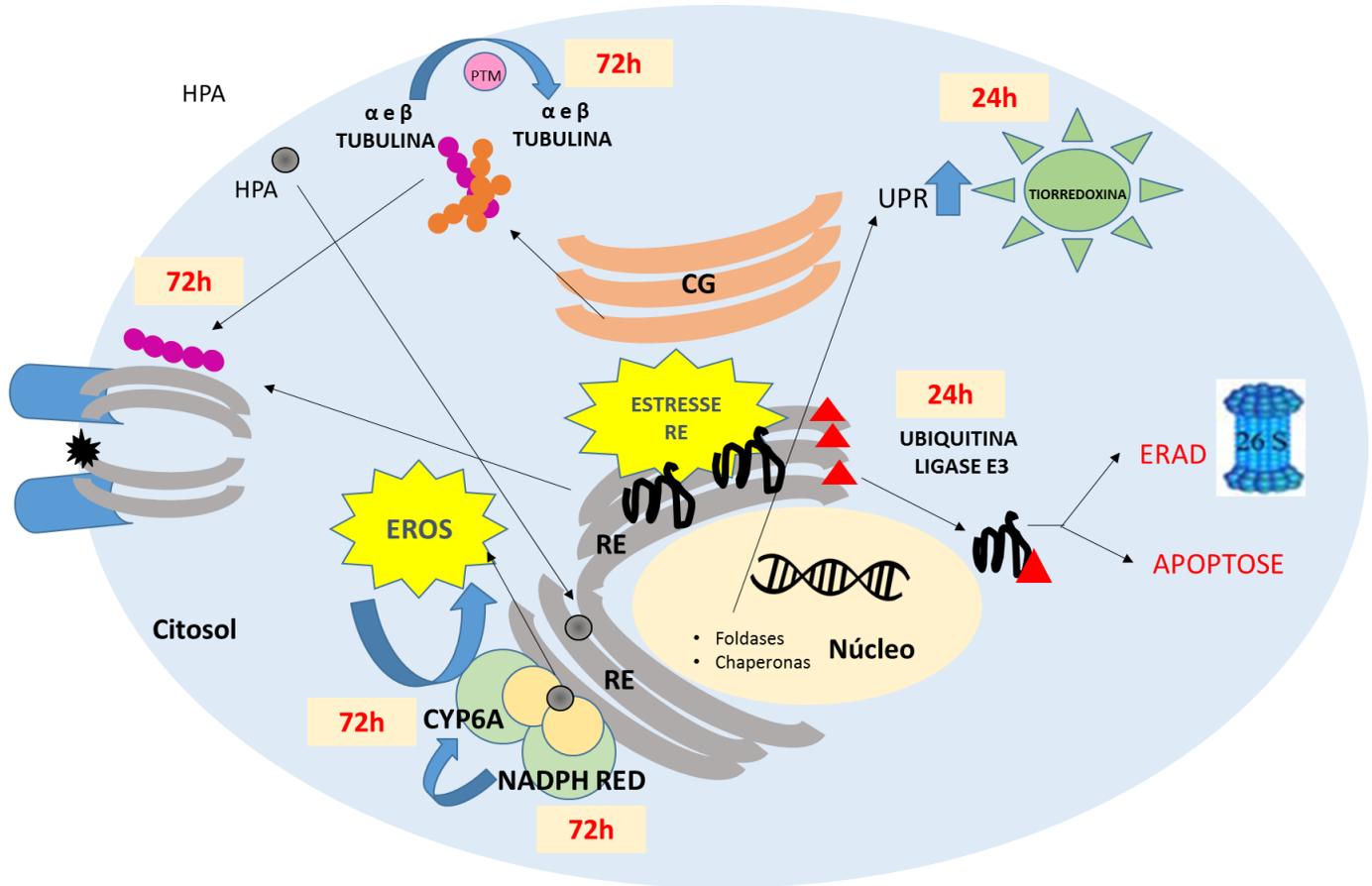


Figura 19. Representação esquemática dos processos gerados na brânquia de *Crassostrea brasiliana* após exposição a 10% FAD. Esses processos foram propostos de acordo com as proteínas identificadas neste estudo, cujo nível de expressão foi alterado frente a exposição, e com base nas suas respectivas funções, juntamente com dados já reportados na literatura. Após a exposição, componentes da FAD atingem o meio intracelular por meio de difusão. Em seguida, a indução de CYP6A ocorre durante a biotransformação. A proteína NADPH citocromo P450 redutase atua na transferência de elétrons, restaurando o estado redox do CYP6A, aparentemente de forma tempo-depende (72 h). O processo de biotransformação gera a formação de EROS gerando estresse oxidativo. Alterações significativas na expressão das proteínas tioredoxina e ubiquitina ligase E3 atuam para reduzir o número de proteínas mal enoveladas no RE e, desta forma, restabelecer a homeostase proteica contra o estresse no RE já em 24h de exposição à FAD. Alterações observadas no nível de expressão de proteínas de citoesqueleto no microsoma estão relacionadas ao incremento de resposta fagocítica, e consequente aumento da imunotoxicidade, bem como com alterações no movimento vesicular por actinas e tubulinas em 72h. Além disso, poder-se-ia sugerir que o aumento do estresse oxidativo também possa estar relacionado com o incremento de alterações pós-traducionais em proteínas do próprio citoesqueleto.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo exploratório revelou pela primeira vez a utilidade da proteômica para avaliar as diferenças na expressão proteica da fração microsomal de brânquias de ostras, *Crassostrea brasiliana*, expostas à FAD, e forneceu a primeira avaliação dos potenciais efeitos do óleo diesel em nível proteico, sobretudo no retículo endoplasmático (RE). Das onze proteínas expressas diferencialmente identificadas neste estudo, sete apresentam potencial de utilização como perfil de expressão proteica (PEP) em brânquias de ostras. Estas proteínas foram categorizadas em três vias funcionais distintas, tais como: metabolismo lipídico / xenobiótico (CYP6A e P450 RED), fagossomo mediados por RE (tubulina) e processamento e degradação de proteínas no RE (tioredoxina e ubiquitina ligase E3). Estas proteínas representam novos biomarcadores potenciais de exposição ao FAD no RE de brânquias de ostras, os quais podem ser utilizados em estudos posteriores. Concluiu-se que a análise de proteínas microsomiais representa uma poderosa ferramenta para avaliar os efeitos de derramamento de óleo no ambiente aquático, bem como para compreender os mecanismos que envolvem o RE frente à exposição a esta classe de xenobiótico. Além disso, recomenda-se a realização de estudos adicionais para confirmar e validar o uso das proteínas aqui identificadas como novos biomarcadores putativos da exposição à FAD numa perspectiva de avaliação de risco e exposição ambiental mais realista. Estudos futuros também são necessários para investigar mais detalhadamente alguns dos mecanismos aqui apontados e/ou sugeridos, como sendo impactados ou responsivos frente a exposição à FAD.

2.7 PERSPECTIVAS

Visando dar continuidade ao estudo realizado, sugerimos as seguintes perspectivas:

Analisar as eventuais modificações pós-tradicionais das proteínas aqui relacionadas, utilizando espectrometria de massa. Analisar, ainda, os mapas proteicos de géis bidimensionais, após coloração com corantes específicos de forma a expor as modificações pós-traducionais específicas, estabelecendo, assim, fosfoproteomas e glicoproteomas em amostras oriundas de ambientes contaminados por óleo diesel.

Com base nas proteínas identificadas, realizar novos estudos, envolvendo, por exemplo, análise da expressão gênica por meio de *qRT-PCR* e avaliação individual da expressão de proteínas-alvo por *western blotting* ou *dot blot*.

Confirmar/validar estas proteínas como biomarcadores moleculares, visando sua utilização no biomonitoramento ambiental utilizando amostras oriundas de ambientes contaminados. Uma das estratégias poderia envolver a quantificação destas proteínas via ensaios de ELISA, por meio da produção de anticorpos específicos.

Realizar a análise estrutural por modelagem computacional, difração por raio X e/ou ressonância magnética nuclear (RMN) de proteínas-alvo identificadas nesse estudo, de modo a contribuir para o conhecimento relacionado com a interação proteína-proteína em ostras *C. brasiliiana*.

CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DAS RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS DE GENES NORMALIZADORES EM *Crassostrea brasiliana* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Gabrielle do Amaral e Silva Müller^{a*}; Daína de Lima^a; Flávia Lucena Zacchi^a; Rômi Sharon Piazza^a; Karim Hahn Lüchmann^b; Jacó Joaquim Mattos^a; Daniel Schlenk^c; Afonso Celso Dias Bainy^{a*}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brasil

^b Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade do Estado de Santa Catarina, Laguna 88790-000, Brasil

^c Department of Environmental Sciences, University of California, Riverside, California 92507, Estados Unidos

Este capítulo foi aceito para publicação no periódico *Environmental Toxicology and Chemistry*

Environ Toxicol Chem. 2017 Feb 4. doi: 10.1002/etc.3755.

***Corresponding Author:**

Afonso C.D. Bainy, E-mail address: afonso.bainy@ufsc.br; Telephone number: + 55 48 3721 6391

O tratamento dos animais realizado neste capítulo é parte integrante da tese de doutorado de Karim Hahn Luchmann (exposição à FAD/PPGBQA/UFSC), Daína de Lima (exposição ao fenantreno e temperatura/PPGBQA/UFSC) e Flávia Lucena Zacchi (exposição ao fenantreno e salinidade/PPGAQI/UFSC).

ABSTRACT

Bivalves are of major importance in aquatic ecosystems and for using in aquaculture. They show remarkable plasticity to environmental changes and are proposed as sentinel organism in biomonitoring programs. Studies related to transcriptional analysis using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in these organisms have notably increased, imposing a need to identify and validate adequate reference genes for an accurate and reliable analysis. A systematic evaluation of reference genes under different environmental stressing conditions and contaminant challenges is required. In the present study, nine commonly used reference genes were selected from transcriptome data of *Crassostrea brasiliiana* in order to identify its suitability as qRT-PCR normalizer genes. The transcriptional pattern of these genes were analyzed in gills of oysters under three different experimental conditions: (i) different temperatures (18°C, 24°C or 32°C) and phenanthrene (100 µg/L) combined exposure; (ii) different salinities (10, 25 or 35) and phenanthrene (100 µg/L) combined exposure and (iii) 10% of diesel fuel water-accommodated fraction (disel-FAD) exposure. Reference gene stability was calculated using four algorithms (geNorm, NormFinder, BestKeeper, comparative delta Ct), and ranked by RefFinder tool. Different sets of genes were suggested for qRT-PCR data normalization, according to the experimental conditions. Transcripts of *ankyrin-like* (*ANK*), *GAPDH-like* and *α tubulin-like* (*TUBA*) genes showed minor changes in different temperatures and PHE combined exposures. Transcripts of *ANK*, *β actin-like* and *β tubulin-like* genes showed better results in oysters kept at different salinities and exposed to PHE, and *ANK*, *TUBA* and *28S ribosomal protein-like* genes showed the most stable transcription pattern in oysters exposed to diesel FAD exposure. This study constitutes the first systematic analysis on reference genes selection for qRT-PCR normalization in *C. brasiliiana*. Throughout all experimental conditions and durations of exposure, *ANK* and *TUBA* genes showed the lowest global variability. These reference genes could be employed in differential transcription studies using qRT-PCR analysis under the same or similar experimental conditions.

Keywords: quantitative PCR, normalizing genes, mangrove oyster, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), abiotic stress.

RESUMO

Os bivalves são de grande importância nos ecossistemas aquáticos e na aquicultura. Eles possuem uma plasticidade notável para as mudanças ambientais e são propostos como organismo sentinela em programas de biomonitoramento. Estudos relacionados à análise transcricional usando PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) nesses organismos aumentaram notavelmente, impondo a necessidade de identificar e validar genes de referência adequados para uma análise precisa e confiável. É necessária uma avaliação sistemática de genes de referência sob diferentes condições de estresse ambiental e desafios de contaminantes. No presente estudo, foram selecionados nove genes de referência comumente utilizados a partir de dados transcriptômicos de *Crassostrea brasiliana* para identificar sua adequação como genes normalizadores qRT-PCR. Os transcritos destes genes foram avaliados em brânquias de ostras sob três condições experimentais: (i) exposição a fenantreno (100 µg/L) em diferentes temperaturas (18°C, 24°C ou 32°C) e; (ii) exposição ao fenantreno em diferentes salinidades (10, 25 ou 35‰) e (iii) exposição a 10% de fração de óleo de diesel acomodada em água (FAD). A estabilidade do gene de referência foi calculada utilizando quatro algoritmos (geNorm, NormFinder, BestKeeper, delta Ct comparativo) e classificada pelo *software* RefFinder. Diferentes conjuntos de genes foram sugeridos para a normalização dos dados de qRT-PCR, de acordo com as condições experimentais. Transcritos de *ankyrina-like* (ANK), *GAPDH-like* e *α tubulin-like* (TUBA) mostraram pequenas alterações em exposições de PHE combinadas com diferentes temperaturas. Os transcritos gênicos de ANK, *β-actina-like* e *β-tubulin-like* mostraram melhores resultados em ostras mantidas em diferentes salinidades e expostas a PHE; ANK, TUBA e *28S ribossomal* apresentaram melhor estabilidade em ostras expostas a FAD. Este estudo constitui a primeira análise sistemática sobre a seleção de genes de referência para normalização de qRT-PCR em *C. brasiliana*. Em todas as condições experimentais, os genes ANK e TUBA apresentaram a menor variabilidade global. Estes genes de referência poderiam ser utilizados em estudos de transcricionais utilizando a análise de qRT-PCR sob as mesmas condições experimentais ou semelhantes.

Palavras-chave: PCR quantitativa em tempo real, genes normalizadores, ostra de mangue, hidrocarboneto aromático policíclico (PAH), estresse abiótico.

3.1 INTRODUÇÃO

A ostra *Crassostrea brasiliana* (*Crassostrea gasar*, LAZOSKI et al., 2011) está amplamente distribuída ao longo da costa brasileira (GALVÃO et al., 2013) e desempenha um papel fundamental como filtradora nos ecossistemas estuarinos. Como organismos sésseis da zona intermareal, as ostras são capazes de tolerar ambientes com significativas e dinâmicas variações nas condições ambientais. Fatores abióticos, como temperatura e salinidade, variam amplamente nos ciclos diários e sazonais, até mesmo a distribuição dessa espécie está relacionada às condições ambientais encontradas. A ostra de mangue suporta temperaturas de 16,1 a 26,6 ° C e salinidades de 8‰ a 34,1‰ (MENZEL, 1991). Esses organismos também experimentam uma ampla gama de impactos antropogênicos diretos e indiretos, incluindo descargas de contaminantes (ZHANG et al., 2012).

As áreas de hábitat desta espécie se sobrepõem com atividades relacionadas ao petróleo tornando a *C. brasiliana* uma espécie importante para o monitoramento do impacto do petróleo. De fato, as ostras têm a capacidade de bioacumular grandes quantidades de compostos tóxicos, o que as capacita como organismos sentinelas para programas de biomonitoramento (LACROIX et al., 2014).

Os estudos de transcrição de genes têm sido muito utilizado na identificação de transcritos, vias e redes subjacentes aos processos celulares e de desenvolvimento (FENG et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa está atualmente realizando estudos, a nível transcricional, para identificar genes alterados por diferentes condições estressantes e desenvolver novas ferramentas de biomarcadores moleculares que possam ajudar a elucidar os mecanismos associados à perturbação do metabolismo causada por xenobióticos em *C. brasiliana* (LÜCHMANN et al., 2011, 2012, 2015).

A PCR quantitativa em tempo real tem sido amplamente utilizada para a análise da transcrição gênica devido à sua alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e alto rendimento (MORI et al., 2008; YANG et al., 2015). Uma deficiente normalização de dados de transcrição pode causar uma quantificação imprecisa e conclusões incorretas (CHAPMAN; WALDENSTRÖM, 2015). Muitos métodos de normalização de dados estão disponíveis para qRT-PCR (revisão em Liu et al., 2015), mas o mais comumente utilizado baseia-se na normalização com genes de referência que apresentem uma transcrição estável entre as condições testadas. Entretanto, vários relatos destacam algumas

dificuldades na identificação de um gene normalizador na análise de qRT-PCR devido à variação inerente do padrão de transcrição gênica em diferentes tecidos, gênero (FILBY; TYLER, 2007) e no desenvolvimento (TANG et al., 2007). Portanto, a seleção de genes normalizadores de referência é crítica para a precisão da análise de qRT-PCR (CHAPMAN; WALDENSTRÖM, 2015; LIU et al., 2015). Várias metodologias têm sido utilizadas para avaliar a estabilidade dos dados de transcrição de genes de modo a auxiliar na seleção de um gene normalizador ideal. Os métodos mais empregados utilizam os softwares (VANDESOMPELE et al., 2002a), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), delta Ct (Δ CT) (SILVER et al., 2006) e RefFinder.

Existem poucos estudos sobre a caracterização de genes normalizadores em ostras (DU et al., 2013). O objetivo deste trabalho foi pesquisar genes normalizadores que possam ser utilizados para análise de transcrição gênica em ostras sob diferentes condições experimentais. Neste trabalho foram utilizadas as seguintes condições: exposição ao fenantreno combinado com dois fatores abióticos (temperatura e salinidade) e exposição a 10% FAD. Os genes relatados aqui constituem uma ferramenta importante para futuros estudos quantitativos de transcrição gênica avaliando os efeitos da exposição a produtos derivados de petróleo como *C. brasiliiana* como espécie sentinela.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e selecionar genes normalizadores para análises transcricionais usando qPCR-RT em *C. brasiliensis* em três diferentes condições experimentais: (i) exposição à 10% FAD; (ii) exposição à fenantreno combinado com diferentes temperaturas e (iii) exposição à fenantreno combinado com diferentes salinidades.

3.2.2 Objetivo específicos

- Verificar a estabilidade de genes normalizadores por meio dos programas matemáticos geNorm, NormFinder, RefFinder, Δ CT e BestKeeper em amostras de ostras submetidas a diferentes condições experimentais;
- Estabelecer o número de genes normalizadores para realizar análise transcricional usando qPCR-RT nas condições experimentais testadas;
- Selecionar genes normalizadores para cada condição experimental;

3.3.1 Animais

Ostras do mangue adultas, *C. brasiliiana*, com tamanho de concha similares entre 5 e 7 cm foram obtidas nas fazendas de ostras na praia do Sambaqui (Laboratório de Moluscos Marinhos, UFSC) em Florianópolis, sul do Brasil e transportadas para o laboratório. Os animais foram mantidos em aquários de 40 L com água do mar filtrada (0.45 µm), sendo 1 animal por 1 L de água do mar, continuamente aerados. As ostras foram alimentadas com microalga (*Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana*) duas vezes por dia, com uma densidade de 3.3×10^6 cels mL⁻¹ and 2.2×10^6 cels mL⁻¹, respectivamente.

3.3.2 Experimentos de exposição

3.3.2.1 Salinidade ou temperatura combinada com exposição por fenantreno (PHE)

Três grupos de 80 ostras foram gradualmente aclimatados nas salinidades de 10, 25 ou 35‰ por sete dias. Outro grupo foi também aclimatado nas temperaturas de 18°C, 24°C e 32°C por sete dias. Valores de salinidade foram escolhidos com base na ocorrência natural dessas salinidades para *C. brasiliiana* que representam condições de hiposalinidade (10 psu), controle (25 psu) e hipersalinidade (35 psu). Ao longo da costa brasileira a temperatura pode variar de 25 a 32 °C, portanto, tentou-se representar baixas temperaturas (18 °C), controle (24 °C) e altas temperaturas (32 °C) (revisado em MENZEL, 1991).

As ostras foram mantidas nas temperaturas ou salinidades descritas acima durante sete dias. Após esse período de aclimação, as ostras foram divididas aleatoriamente em aquários de vidro de 40 L e colocadas nas temperaturas e salinidades selecionadas (40 animais por tanque). O PHE foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) e em seguida, adicionado a cada aquário de exposição (um para cada condição experimental de temperatura ou salinidade) para alcançar a concentração nominal de 100 µg/L. A máxima concentração de DMSO utilizada foi 0.002% (v/v). Cada aquário foi individualmente aerado e coberto com tampa de vidro a qual foi selada para minimizar a evaporação de PHE. As concentrações de PHE foram escolhidas com base nas respostas da transcrição gênica previamente observada em *C. brasiliiana*

(LÜCHMANN et al. 2015). Nos grupos controle (um por condição experimental de salinidade ou temperatura), os animais foram submetidos às mesmas condições que os grupos expostos, exceto pela adição de 0.002% (v/v) DMSO sem PHE. Os períodos de exposição foram selecionados com base na transcrição gênica (24h) e atividade enzimática (96h), observados previamente em *C. brasiliiana* exposta a PHE (LÜCHMANN et al. 2015). Durante a exposição, animais controle e expostos não foram alimentados para evitar potencial bioacumulação de PHE pela alimentação. Ao final de cada período experimental, 10 animais de cada aquário foram mortos e as brânquias foram imediatamente dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para a realização das análises moleculares.

3.3.2.2 Exposição à fração de óleo diesel acomodada em água (FAD)

As ostras foram aclimatadas por sete dias como descrito acima. A preparação da fração FAD seguiu o protocolo descrito anteriormente (SINGER et al., 2000). A concentração de 10% foi selecionada com base nos resultados anteriores observados em *C. brasiliiana* (LÜCHMANN et al., 2011). A exposição foi realizada em duplicata (para cada tempo) em aquários com capacidade para 40 L, com 30 ostras em cada aquário, durante 24 e 72h sob as mesmas condições de temperatura, salinidade e fotoperíodo apresentadas anteriormente. Um grupo controle também foi utilizado, no qual os animais foram expostos somente à água do mar. Os animais não foram alimentados durante o período de exposição. Após os períodos de exposição (24 e 72h), as brânquias de 10 ostras de cada réplica foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para posterior realização de análises moleculares. Estes procedimentos foram aplicados tanto para os organismos do grupo controle, como dos expostos. Logo após o período de exposição, 10 animais de cada aquário foram mortos e as brânquias imediatamente dissecadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização das análises moleculares.

3.3.3 Seleção de genes normalizadores e desenho de iniciadores

Nove genes candidatos a normalizadores foram escolhidos com base em estudos de transcrição gênica realizados com bivalves nos últimos anos. A Tabela 5 mostra a lista dos genes e a sequência de seus iniciadores testados no presente trabalho, contendo genes

tradicionalmente utilizados como a β *actina like* (ACTB, FENG et al. 2013; IZAGIRRE et al. 2014) e genes menos utilizados como *anquirina* (ANK), envolvido na manutenção do citoesqueleto em *C. gigas* (ZHAO et al., 2012). A sequência de iniciadores de α *tubulina-like* (TUBA) e β *tubulina-like* (TUBB) foi escolhida a partir de estudos prévios (LÜCHMANN et al., 2012). Os demais iniciadores foram desenhados a partir do banco de sequências nucleotídicas oriundas do transcriptoma de *C. brasiliensis* (LÜCHMANN et al. 2015) usando o software IniciadoresQuest® (<https://www.idtdna.com/Scitools>). Os parâmetros utilizados foram: tamanho do produto amplificado 70–150 bp, temperatura de fusão entre 58 e 62°C, tamanho dos iniciadores de entre 20 e 26 pb e porcentagem de GC entre 40 e 60%. A detecção de dímeros foi avaliada por meio do programa FastPCR (KALENDAR & LEE, 2014).

Em seguida, as sequências dos iniciadores foram submetidas ao programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de sequências não redundantes (nr database) do NCBI (e-value threshold of 10^{-6}), seguida pela pesquisa por domínios proteicos conservados (protein-conserved domains) utilizando o Conserved Domains Database (CDD) (MARCHLER-BAUER et al., 2011). Esta etapa foi realizada para avaliar a qualidade dos iniciadores gerados. Os iniciadores de *ACTB* continham domínios conservados identificados pelo descritor cd00012 (NBD_sugar-kinase_HSP70_actin, Actin superfamily) e domínio encontrados na base de dados Pfam (pfam00022/Actin). A *ANK* putativa foi identificada pelos domínios cd00204 (Ankyrin repeats protein) e pfam12796 (Ank_2, Ankyrin repeats). O gene *40S Ribosomal protein S9 like* contém os domínios PTZ00155 (40S ribosomal protein S9) e COG0522 (RpsD, Ribosomal protein S4). No gene *40S Ribosomal protein S3 like* foi encontrado o domínio cd02413 (40S_S3_KH, domain of the eukaryotic 40S small ribosomal subunit protein S3) e pfam00189 (EF1_alpha_III, 40S_S3_KH, Ribosomal protein S3). No gene *eukaryotic elongation factor α like (EF- α)* foram identificados os domínios cd03705 (EF1_alpha_II, Domain III of EF-1) e pfam00009 (GTP_EFTU, Elongation factor Tu GTP binding domain). Finalmente, o gene *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* apresentou os domínios pfam02800 (Gp_dh_C, Glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase, C - terminal domain) e COG0057 (GapA, Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase/ erythrose - 4 -phosphate dehydrogenase).

3.3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das brânquias (aproximadamente 100 mg) dos dez indivíduos de cada grupo experimental utilizando 1 mL reagente Qiazol (Qiagen), seguido da homogeneização mecânica do tecido utilizando o aparelho Tissue-Tearor® (BioSpec Products). Após a homogeneização, os tubos contendo o homogenizado foram mantidos em temperatura ambiente por 1h. Clorofórmio foi adicionado ao homogenizado para separar as fases orgânicas através de centrifugação. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado pela adição de isopropanol, esse precipitado foi lavado com etanol 75% antes da ressuspensão em água livre de RNase. A concentração e pureza do RNA de cada amostra foi analisada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific). Somente amostras com alto grau de pureza ($OD_{260/280} > 1.8$, $OD_{260/230} > 1.8$) foram processadas e imediatamente armazenadas a -80°C . Logo após, o RNA foi tratado com DNaseI (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante. A transcrição reversa para a síntese de cDNA, a partir de 1 μg de RNA total, foi realizada utilizando o QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen). A quantificação do cDNA foi realizada como descrito anteriormente e a amostra foi armazenada a -20°C para as análises subsequentes.

Tabela 5. Sequência de iniciadores utilizadas para as análises de qRT-PCR.

Gene (Abreviação)	Número de acesso ou ID do gene de ostra	Sequência do iniciador 5'-3' (Senso and anti-senso)	Tamanho do produto amplificado (bp)	Função Molecular	Referência
<i>β actina like</i> (ACTB)	NM_001308859.1	S:TTGGTGACGATGCCGTGTTCAATGG A:CCAGACATCAGGGTGTATGGTTGGTATG	122	Citoesqueleto	Este estudo
<i>α tubulina like</i> (TUBA)	XM_013563113.1	S:TGA GGC CCG TGA AGA TCT TGCTGC A:ACCACCCTCCTCTTCAGCTTCACCT	91	Citoesqueleto	Luchman et al., 2012
<i>β tubulina like</i> (TUBB)	XM_011415719.1	S:GGGCTAAGGGACACTACACAGAAGGAGC A:TGTTCCCATACCAGATCCGGTGCCA	146	Citoesqueleto	Luchman et al., 2012
<i>anquirina like</i> (ANK)	XM_011434745.1	S:CATTGGTCGTCCTATTGAACAATCTAAA A:AAGTGATAAAGGTAATTCTCACACAACC	84	Citoesqueleto	Este estudo
<i>28S ribosomal proteína like (28S)</i>	EKC36428	S:CCCGAAGCCAAACACATTCAAGTGG A:GGCTTTCCATTGCGGTCACCTTAG	131	Subunidade ribossomal	Este estudo
<i>40S ribosomal proteína subunit S3 like</i> (40S3)	XM_011447431.1	S:CCTGTTATGGAGTGCTACGGTTTATC A:CATTGACTTGGCTCTCTGTCCTC	78	Subunidade ribossomal	Este estudo
<i>40S ribosomal proteína subunit S9 like (40S9)</i>	XM_011440006.1	S:CCTGTTCCCTTCTTGGCATTCTT A:TGACTTCTCCCTCAGATCACCATA C	98	Subunidade ribossomal	Este estudo
<i>Fator de alongamento 1-α like (EFA)</i>	NM_001305313.1	S:ATTGACCAGAGAACCATCGCCAAGT A:ACGCTCAGCCTTGAGTTTGTCCAATA	102	Síntese proteica	Este estudo
<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)</i>	XM_011446602.1	S:CAGTCCTTGTTACTGGGTCCATCTAC A:TGTCTAGCTCCTCTTGCGAAAGTTATT C	122	Metabolismo energético	Este estudo

3.3.5 Análise de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A análise de qRT-PCR foi realizada com sete animais ($n=7$) expostos à FAD, 10 animais ($n = 10$) expostos a PHE em diferentes salinidades e 10 animais ($n =10$) expostos a PHE em diferentes temperaturas. O nível de transcrição dos genes foi medido através de reações de PCR em tempo real utilizando QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). As reações de amplificação foram realizadas com 1 μM de cada iniciador, 10 μL QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen) e 8 μL de cDNA (100 ng/reaction) totalizando 20 μL de volume de reação. Em seguida, essa reação foi adicionada ao termociclador Rotor-Gene TM 6000 real-time qRT-PCR system (Corbett Life Science) com o seguinte programa: 5 min a 60°C, 40 ciclos de 10s a 95°C e 30s a 60°C, de acordo com instruções do fabricante. O produto de PCR foi submetido à análise da curva de temperatura de fusão entre 55° a 95°C, sendo que a cada 1°C adquire-se a fluorescência verde. No intuito de identificar a presença de produtos não específicos e dímeros de iniciadores, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%.

A eficiência da reação de PCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores através de uma curva de calibração de diluição seriada com cinco concentrações. Todas as curvas apresentaram R^2 superior a 0,98 e E entre 95% e 105%. Os valores de *cycle threshold* (Ct) correspondem ao número de ciclos em que a emissão de fluorescência monitorada em tempo real ultrapassa o limite superior (*threshold limit*) e excede o valor de *background* de fluorescência. A transcrição gênica foi determinada como o número de ciclos necessários para a amplificação alcançar a fase exponencial da reação de PCR. Ct e E foram obtidos utilizando o software de sistema de qRT-PCR de Rotor-Gene 6000 em tempo real (Tabela 6).

3.3.6 Análise da estabilidade gênica

A estabilidade dos genes testados como normalizadores foi avaliada através de quatro programas computacionais comumente utilizados. geNorm calcula o valor de “M” para cada gene com base na média de variação par-a-par entre o gene de interesse e todos os genes controles (VANDESOMPELE et al., 2002b). NormFinder fornece um valor de estabilidade para cada gene candidato visando identificar o gene normalizador mais estável (ANDERSEN; LEDET-JENSEN; ORNTOFT, 2004). BestKeeper usa correlações entre pares (PFAFFL et al., 2004) e o método comparativo Δ^{CT} classifica a estabilidade do gene normalizador

de acordo com a reprodutibilidade das diferenças de transcrição gênica (SILVER et al., 2006). RefFinder (www.leonxie.com/referencegene.php) baseia-se na classificação do gene normalizador fornecido para cada programa e, em seguida, atribui um peso adequado a um gene individual e obtém uma média geométrica de seus pesos para a classificação geral final (XIE et al., 2012).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Eficiência de amplificação de genes de referência por qPCR-RT

Os transcritos dos nove genes normalizadores testados (*ACTB*, *TUBA*, *TUBB*, *ANK*, *28S*, *40S3*, *40S9*, *GAPDH* e *EFA*) foram selecionados para avaliação da estabilidade gênica em três condições experimentais diferentes. As curvas de fusão para todos os genes demonstraram um único pico confirmando a amplificação específica. Os valores dos coeficientes de correlação (R^2) foram maiores que 0,99 e as eficiências das corridas de qRT-PCR variaram entre 95% e 106% (Tabela 6). A análise da transcrição gênica mostrou uma variação em média de 12,53 a 28,42 em todos os experimentos testados (Figura 20). Com relação aos valores de Ct, o gene *TUBB* apresentou maior quantidade de transcritos, enquanto que o *28S* foi o que apresentou menores quantidades (valores de Ct de 12,53 e 28,42, respectivamente).

Tabela 6. Valores *cycles threshold* (Ct) e eficiências (E) da qRT-PCR dos genes de referências candidatos.

Genes	SAL + PHE			TEMP + PHE			10% FAD		
	Ct	SD	E (%)	Ct	SD	E (%)	Ct	SD	E (%)
<i>ACTB</i>	19,86	0,79	99	20,05	1,70	95	18,71	1,10	100
<i>TUBA</i>	20,86	1,08	100	21,95	0,52	99	20,88	0,98	106
<i>TUBB</i>	14,13	1,48	100	14,07	3,06	103	12,53	0,42	100
<i>ANK</i>	22,33	1,09	100	20,83	1,34	100	20,91	0,39	100
<i>28S</i>	23,63	1,12	99	27,01	2,75	100	28,42	1,10	100
<i>40S3</i>	17,00	2,18	98	18,26	4,20	102	13,99	0,25	100
<i>40S9</i>	13,49	0,46	100	19,79	5,02	100	17,39	0,24	100
<i>EFA</i>	15,90	3,11	100	17,50	2,72	100	17,27	0,33	100
<i>GAPDH</i>	19,82	1,75	99	18,21	1,32	100	18,12	0,60	100

Cycles threshold (Ct): corresponde à média de Cts de cada gene em cada condição;

Standard curve (SD): corresponde ao desvio padrão N = 7 (FAD), N = 10 (TEMP + PHE), N = 10 (SAL + PHE);

As eficiências (E) em (%): correspondem à eficiência quantitativa de qRT-PCR dos genes de referência candidatos, calculados a partir de curvas padrão de cinco pontos utilizando uma série de cinco diluições de cDNA de *C. brasiliensis* em cada condição experimental.

3.4.2 Análise da estabilidade da transcrição gênica pelo método RefFinder

As estabilidades da transcrição gênica nas diferentes condições estão representadas nas Figuras 16-18, em que o menor ranking representa maior estabilidade.

A *ANK* foi o único gene que esteve entre os três mais estáveis nos três diferentes tratamentos (Figura 21-23). Na exposição de temperatura combinada com PHE, os genes mais estáveis foram *ANK* seguida por *GAPDH* e *TUBA* (Figura 21A). A média geométrica dos valores de ranking foram 1,41, 2,06 e 3,16, respectivamente. A ordem do ranking segundo o refFinder foi *ANK>GAPDH>TUBBA>EFA>ACTB>40S3>TUBB>40S9>28S* nas amostras dos animais expostos a PHE em diferentes temperaturas exposição de temperatura combinada com PHE. Os três genes que apresentaram um padrão de transcrição gênica mais estável nos animais expostos a PHE em diferentes salinidades, de acordo com o método RefFinder foram *ANK*, *ACTB* e *TUBB* com valores 1,57, 2,34 e 2,82, respectivamente (Figura 22A). O ranking obtido foi *ANK>ACTB>TUBB>GAPDH>40S9>40S3>28S>EFA>TUBA*. *TUBA*, *28S* e *ANK* foram os genes normalizadores mais estáveis em ostras expostas à FAD, com valores de 1,32, 2,00 e 2,71, respectivamente (Figura 23A). Neste experimento o ranking dos genes foi *TUBA>28S>ANK>40S3>ACTB>GAPDH>EFA>TUBB>40S9*.

Os genes testados como normalizadores *28S*, *TUBB*, *EFA* e *40S9* ficaram entre os três genes menos estáveis em pelo menos duas condições experimentais (Figura 21-23). Nos animais expostos a PHE em diferentes salinidades o gene *TUBA* foi o menos estável (Figura 22).

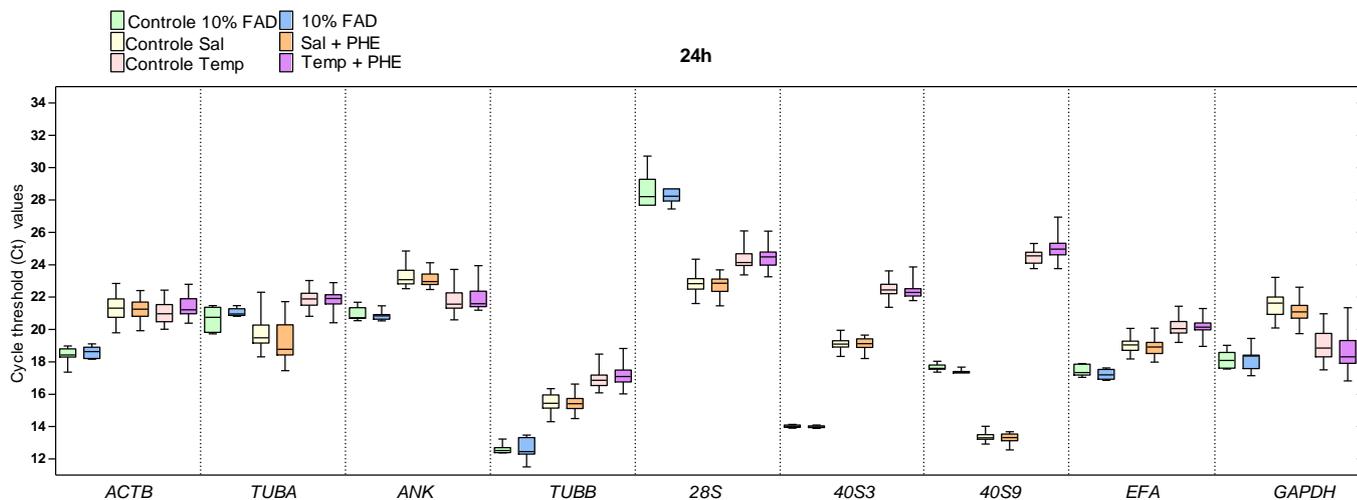


Figura 20. Quadro de valores absolutos de Ct contendo a expressão dos nove genes testados como normalizadores nas três condições experimentais: ostras expostas à FAD; ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas; e ostras expostas a PHE em diferentes salinidades. A mediana está indicada por uma linha em cada caixa na horizontal, que por sua vez representa o percentual entre 25 e 75. Traços para baixo indicam o menor valor e para cima até o maior.

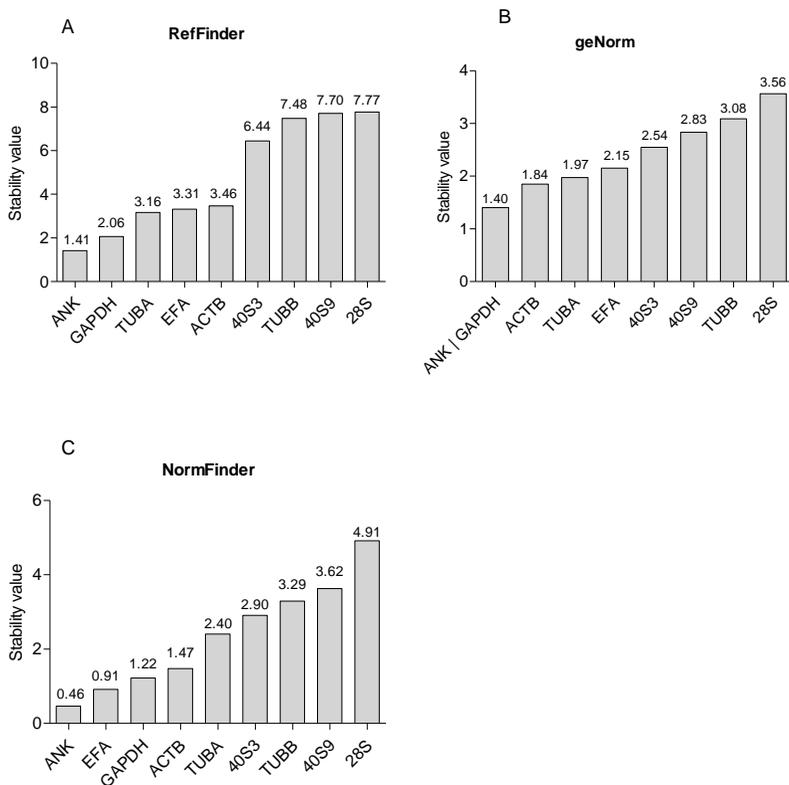


Figura 21. Análise da estabilidade da transcrição dos genes testados como normalizadores após exposição a PHE em diferentes temperaturas. Os valores de estabilidade dos nove genes foram avaliados em cada condição experimental e calculados com RefFinder (A), GeNorm (B) e Normfinder (C). Os valores mais baixos representam transcrição gênica mais estável.

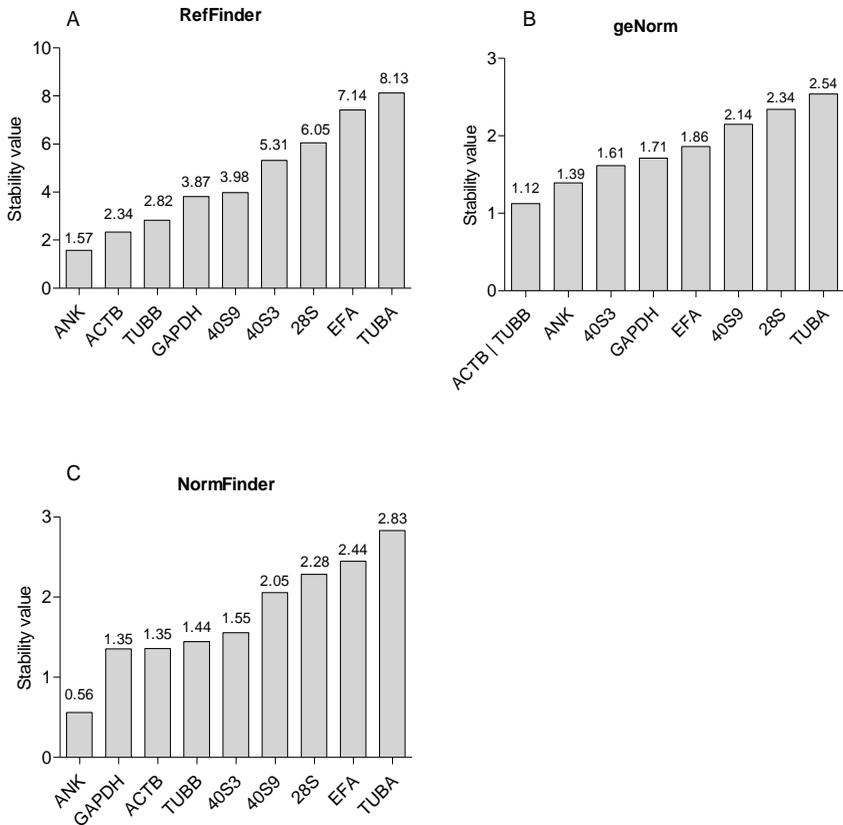


Figura 22. Análise da estabilidade da transcrição dos genes testados como normalizadores nos animais expostos a PHE em diferentes salinidades. Os valores de estabilidade dos nove genes testados foram avaliados em cada condição experimental e calculados com RefFinder (A), GeNorm (B) e Normfinder (C). Os valores mais baixos representam transcrição gênica mais estável.

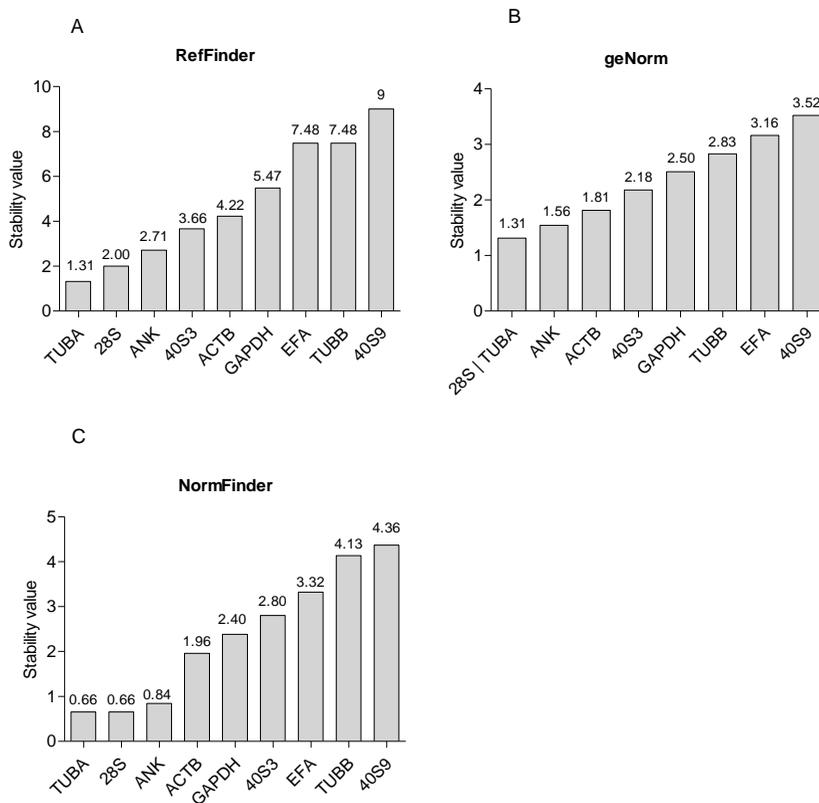


Figura 23. Análise da estabilidade da transcrição dos genes testados como normalizadores em ostras expostas à FAD. Os valores de estabilidade dos nove genes testados foram avaliados em cada condição experimental e calculados com RefFinder (A), GeNorm (B) e Normfinder (C). Os valores mais baixos representam transcrição gênica mais estável.

3.4.3 Análise da estabilidade da transcrição gênica usando os demais métodos matemáticos

3.4.3.1 Método geNorm

A estabilidade gênica gerada por geNorm foi muito similar aos resultados obtidos pelo RefFinder, a ordem gênica do ranking apresentou pequenas diferenças. A combinação mais estável de genes para análise da transcrição gênica em ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas

foi *ANK* e *GAPDH* (valor = 1,41) (Figura 21B); em ostras expostas a PHE em diferentes salinidades foi *ACTB* e *TUBB* (valor = 1,12) (Figura 22B) e em ostras expostas à FAD foi *TUBA* e *28S* (valor = 1,31) (Figura 23B).

3.4.3.2 Método NormFinder

De acordo com o método NormFinder, o ranking de estabilidade gênica do mais estável para o menos estável foi *ANK>EFA>GAPDH>ACTB>TUBA>40S3>TUBB>40S9>28S* para ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas (Figura 21C). Na exposição a PHE em diferentes salinidades, o ranking dos genes testados em ostras foi *ANK>GAPDH>ACTB>TUBB>40S3>40S9>28S>EFA>TUBA* (Figura 22C). Nos animais expostos à FAD, a sequência de estabilidade foi *TUBA>28S>ANK>ACTB>GAPDH>40S3>EFA>TUBB>40S9* (Figura 23C).

3.4.3.3 Método Delta Ct

O ranking de estabilidade gerado pelo método Δ Ct foi similar ao obtido pelo NormFinder. Portanto, os três genes mais estáveis em ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas foram *ANK*, *EFA* e *GAPDH*, já em ostras expostas a PHE em diferentes salinidades foi *ANK*, *ACTB* e *GAPDH*, e, ostras expostas à FAD foi *TUBA*, *28S* e *ANK* (Figure 24B).

3.4.3.4 Método BestKeeper

O ranking da estabilidade gênica pelo método BestKeeper foi diferente comparado aos demais resultados gerados pelos outros métodos. BestKeeper identificou *TUBA* e *GAPDH* como sendo os genes mais estáveis em ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas; e *40S9* e *ANK* em animais expostos à FAD. *TUBA* foi selecionado como o gene com menor variação dos nove genes candidatos, com SD de 0,54 e valores de CV de 2,51 em ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas (Figure 24A).

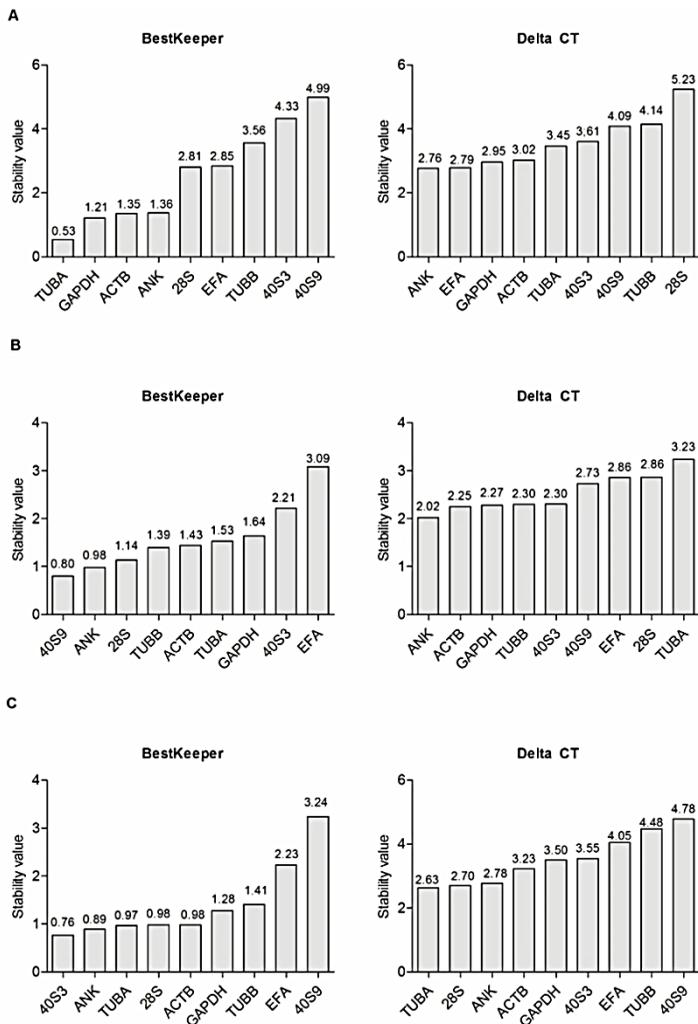


Figura 24. A análise de estabilidade da transcrição dos nove genes testados como normalizadores foi calculada por ΔCt e BestKeeper. Estabilidade de transcrição dos genes normalizadores nas seguintes amostras: A) Exposição a PHE em diferentes temperaturas; B) Exposição a PHE em diferentes salinidades C) exposição à FAD.

Tabela 7. Classificação de acordo com a estabilidade dos nove genes de referência analisados pelo algoritmo RefFinder.

10 % FAD		Temperatura + PHE		Salinidade +PHE		
	Classificação dos genes	Valor de estabilidade	Classificação dos genes	Valor de estabilidade	Classificação dos genes	Valor de estabilidade
1	<i>TUBA</i>	1,32	<i>ANK</i>	1,41	<i>ANK</i>	1,57
2	<i>28S</i>	2,00	<i>GAPDH</i>	2,06	<i>ACTB</i>	2,34
3	<i>ANK</i>	2,71	<i>TUBA</i>	3,16	<i>TUBB</i>	2,83
4	<i>40S3</i>	3,66	<i>EFA</i>	3,31	<i>GAPDH</i>	3,81
5	<i>ACTB</i>	4,23	<i>ACTB</i>	3,46	<i>40S9</i>	3,98
6	<i>GAPDH</i>	5,48	<i>40S3</i>	6,45	<i>40S3</i>	5,32
7	<i>EFA</i>	7,48	<i>TUBB</i>	7,48	<i>28S</i>	6,05
8	<i>TUBB</i>	7,48	<i>40S9</i>	7,71	<i>EFA</i>	7,42
9	<i>40S9</i>	9,00	<i>28S</i>	7,77	<i>TUBA</i>	8,13

3.5 DISCUSSÃO

A ostra do mangue *Crassostrea brasiliiana* ocorre naturalmente ao longo da costa brasileira em ambientes afetados frequentemente por contaminantes antrópicos, incluindo HPA. Estudos envolvendo a exposição desses organismos a HPA, combinados com variações nos fatores abióticos, podem ajudar a entender a influência de diferentes fatores na resposta biológica dos animais e prever a suscetibilidade. Recentemente, o transcriptoma de *C. brasiliiana* foi publicado e diversos genes foram anotados de acordo com suas categorias funcionais putativas (LUCHMANN et al., 2015). O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) é uma técnica confiável e reprodutível para avaliar alterações na transcrição gênica, à qual requer a utilização de genes normalizadores para uma maior precisão analítica. Uma vez que poucos genes normalizadores foram sistematicamente avaliados em *C. brasiliiana*, identificamos neste estudo um conjunto de genes potenciais para serem normalizadores em diferentes condições experimentais de exposição a misturas complexas de HPA, ou HPA isolados em diferentes condições de salinidade e temperatura da água.

Em geral, os genes utilizados para a manutenção da função celular básica são comumente empregados como genes normalizadores porque tendem a ser transcritos em um nível constante entre diferentes tecidos, estados de doença, ciclo celular e estágios de desenvolvimento (KOZERA; RAPACZ, 2013). Para a seleção de genes normalizadores, os dados de qRT-PCR de nove genes candidatos foram analisados utilizando algoritmos estatísticos (JACOB et al. 2013; LU et al. 2013; FENG et al. 2013; ZHU et al. 2014; ZHENG et al. 2014; LIU et al. 2015).

O algoritmo geNorm calcula o valor de estabilidade da expressão (M) para cada gene e, em seguida, faz uma variação em pares (V) deste gene com o outro (VANDESOMPELE et al., 2002b). O NormFinder leva em consideração a análise das variações intra e intergrupo para normalização (ANDERSEN; LEDET-JENSEN; ORNTOFT, 2004). O BestKeeper usa dados brutos para determinar os padrões mais adequados e os combina pela variação de pares (PFAFFL et al., 2004). Os rankings fornecidos por dois dos programas (NormFinder e Δ CT) foram semelhantes entre si, enquanto que o BestKeeper normalmente relatou resultados diferentes em comparação com os outros programas.

O algoritmo do programa geNorm indicou o uso dos genes *ANK* e *GAPDH* como mais estáveis nos animais expostos a PHE em diferentes temperaturas. Já os dados obtidos no NormFinder e Δ CT indicaram a

ANK e BestKeeper indicou o gene *TUBA*. A análise de GeNorm indicou o uso de *ACTB* e *TUBB* para os transcritos de ostras expostas a PHE em diferentes salinidades. Neste experimento, o método NormFinder e ΔCT indicaram a utilização de *ANK* (Figura 17, A-C) e a análise de BestKeeper indicou *40S9* (Figura 19) como genes normalizadores. Nos animais expostos à FAD, geNorm mostrou que *28S* e *TUBA* foram os genes mais estáveis, NormFinder e ΔCT indicaram *TUBA* (Figura 18, A-C) e BestKeeper indicou *40S3* (Figura 19). Essas discrepâncias entre a determinação do algoritmo mais apropriado para a escolha do gene normalizador também foram observadas em trabalhos anteriores e estão associadas à diferentes sensibilidades dos genes e eventual co-regulação (LU et al. 2013; ZHENG et al. 2014). Então, para determinar o melhor gene normalizador foi utilizado o programa RefFinder (XIE et al., 2012). Este software classifica a estabilidade usando os dados de outros programas computacionais (geNorm, Normfinder, BestKeeper) e o método comparativo ΔCt .

As anquirinas são moléculas expressas ubiquamente associadas ao citoesqueleto na base da espectrina e várias proteínas de membrana. Possui diversas funções relacionadas à organização estrutural celular básica, e apresenta interações protéicas com actina e tubulina (BENNETT; BAINES, 2001). Zhao et al. (2012) observaram uma super-expressão da anquirina, tubulina e sugeriram que ela pode ser relevante para o direcionamento de proteínas de transporte iônico e rearranjo do citoesqueleto, visando a manutenção do equilíbrio da pressão osmótica interna e externa no estresse salino. Por outro lado, no presente estudo, todos os algoritmos testados indicaram que o gene da *anquirina*-like (*ANK*) era um dos mais estáveis, sendo sempre classificado entre as três primeiras posições em todas as condições experimentais testadas. Com base nestes resultados sugere-se que este gene pode ser considerado em futuros estudos como um gene normalizador para a análise transcricional em bivalves sob condições experimentais semelhantes.

A proteína codificada pela β *actina*-like (*ACTB*) desempenha um papel na contração muscular, motilidade celular, divisão celular e este gene é frequentemente utilizado como um gene normalizador (LU et al., 2013). *ACTB* foi recentemente utilizado como gene normalizador em um estudo realizado para investigar os efeitos do estresse térmico associado à exposição ao Cd em biomarcadores moleculares do sistema endolisossômico na glândula digestiva do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (IZAGIRRE et al., 2014). *ACTB* também foi empregado com sucesso como um gene normalizador para verificar a resposta ao choque térmico e os processos de biotransformação em glândula

digestivas de *M. galloprovincialis* expostas a benzo [a] pireno (B [a] P - 75 nM) e a diferentes temperaturas (18, 20 e 22 °C) (KAMEL et al., 2012).

Por outro lado, no presente trabalho *ACTB* foi um dos genes menos estáveis em quase todas as condições experimentais testadas, incluindo exposições de ostras a PHE em diferentes temperaturas, bem como expostas à FAD. Resultados semelhantes demonstraram que *ACTB* não foi estável em ostras submetidas ao estresse térmico em *C. gigas* (ZHANG et al., 2016) e *Patinopecten yessoensis* (FENG et al., 2013).

Em geral, os genes normalizadores associados à função ribossomal (*28S*, *40S3* e *40S9*) apresentaram maiores variações nos seus transcritos em todos os tratamentos. De acordo com RefFinder e NormFinder, os transcritos dos genes *28S* e *40S9* foram menos estáveis em ostras expostas a PHE em diferentes temperaturas. Observou-se uma resposta semelhante nas ostras expostas à FAD e expostas ao PHE em diferentes salinidades. A maioria dos algoritmos mostrou que *40S9* era o gene menos estável.

GAPDH e *EF-1 α* são comumente utilizados como genes normalizadores em estudos transcricionais de muitos organismos, incluindo *C. gigas* sob uma série de condições experimentais: estádios de desenvolvimento embrionário e larval, exposição ao ar, choque térmico, contaminação por hidrocarbonetos e desafio bacteriano (FABILOUX et al., 2004; GONZALEZ et al., 2007; KAWABE & YOKOYAMA, 2011). A enzima codificada pelo gene *GAPDH* desempenha um papel importante no metabolismo energético e este gene é frequentemente referido como "gene normalizador clássico" (JONGE et al., 2007). Os transcritos de *GAPDH* neste estudo foram variáveis dependendo das condições experimentais. Kozera e Rapacz (2013) concluíram que a *GAPDH* apresenta respostas transcricionais variáveis sugerindo que ela está envolvida não apenas no processo celular fundamental, mas também pode ser significativamente influenciada por outros processos durante o experimento (KOZERA; RAPACZ, 2013). O fator de alongamento α -like (EFA) é uma das quatro subunidades da EF-1 eucariótica e desempenha um papel fundamental na tradução de proteínas (BROWNE; PROUD, 2002). Com base nos resultados de Δ Ct e NormFinder, verificou-se que o gene *EFA* foi o gene mais estável nos animais expostos a PHE em diferentes temperaturas, comparado com os animais expostos a PHE em diferentes salinidades ou expostos à FAD. O gene *EFA* foi classificado como o quarto gene mais estável nos animais expostos a PHE em diferentes temperaturas e, de acordo com RefFinder foi sugerido como gene normalizador. Resultados semelhantes foram observados em

diferentes estádios de embrião / larva, enquanto em diferentes tecidos, foi estável em Yesso Scallop *Patinopecten yessoensis* (FENG et al., 2013).

O número de genes normalizadores foi analisado para propiciar uma normalização acurada de qRT-PCR. Foi observado que dois genes normalizadores foram suficientes para quantificar os valores de transcrição pelo GeNorm em todos os desenhos experimentais testados. De fato, é necessária uma combinação específica de genes normalizadores de referência quando são adicionadas mais amostras e / ou outras variáveis a um estudo (ZHU et al., 2014). Conjuntos de amostras mais complexas podem produzir uma maior variabilidade nos genes normalizadores e é proposto que até dois genes sejam adequados para a normalização de dados de qRT-PCR. Resultados semelhantes foram observados por Du et al. (2013), que definiram que a análise de dois genes normalizadores (*RL7* e *RS18*) por GeNorm eram suficientes em estudos de transcrição genética em larvas de ostra (DU et al., 2013). Feng et al. (2013) recomendou três genes normalizadores para cada um dos dois conjuntos de amostras entre os tecidos e embriões / larvas de vieira yesso *Patinopecten yessoensis*.

Uma conclusão importante deste estudo é que não existem genes normalizadores universais que possam ser utilizados para a análise de qRT-PCR em todos os tratamentos experimentais testados. Esses resultados confirmam a necessidade de analisar a resposta transcricional de vários genes normalizadores antes de realizar uma análise adicional dos genes alvo em *C. brasiliiana*. Além disso, as condições experimentais devem ser consideradas porque também podem afetar a estabilidade na transcrição de genes normalizadores, tais como período de exposição, tipo de tecido, estágio de desenvolvimento entre outros.

Para a quantificação de transcritos por qRT-PCR recomenda-se, em concordância com a literatura, o uso ideal de pelo menos 2 a 3 genes normalizadores e que sejam analisados por pelo menos 3 algoritmos de estabilidade (JACOB et al., 2013).

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro a avaliar diferentes genes normalizadores para análise de qRT-PCR em brânquias de *C. brasiliana* expostas à PHE em diferentes condições de temperatura e salinidade, ou expostas à mistura complexa FAD. Identificamos diferentes conjuntos de genes que são adequados para a normalização de dados de qRT-PCR em cada desenho experimental. Os transcritos de *ANK*, *GAPDH* e *EFA* foram os mais estáveis para as ostras expostas a PHE a diferentes temperaturas. Os transcritos de *ANK*, *ACTB* e *TUBB* foram selecionados para as ostras expostas a PHE em diferentes salinidades. E, os transcritos de *TUBA*, *28S* e *ANK* foram indicados para análise das ostras expostas à FAD. *ANK* foi considerado candidato promissor como gene normalizador para estudos posteriores. Os genes normalizadores aqui relatados poderão ser úteis para a quantificação de outros genes importantes em vários processos biológicos em *C. brasiliana*, e também na seleção de genes normalizadores em outras espécies de ostras ou bivalves.

3.7 PERSPECTIVAS

Para darmos continuidade aos resultados apresentados neste capítulo, as perspectivas são:

Validação dos genes normalizadores sugeridos neste trabalho nas análises de qPCR-RT em estudos de análise de transcrição gênica em *C. brasiliensis*.

Realizar a triagem de novos genes em outras condições experimentais por meio dos programas matemáticos utilizados neste trabalho.

Concentrar esforços na seleção de genes normalizadores de acordo com as diferentes variáveis, tais como espécie, tecido, tempo de exposição a contaminantes e estágio de desenvolvimento.

CAPÍTULO 4 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO 6-HIDROXICRISENO NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

Gabrielle do Amaral e Silva Müller¹; Graciél Diamante²; Afonso Celso Dias Bainy¹; David Volz²; Daniel Schlenk²

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brasil

² Departamento de Environmental Sciences, Universidade da Califórnia, Riverside, California 92507, Estados Unidos.

***Corresponding Author:**

E-mail address: dschlenk@ucr.edu; Telephone number: + 1 951-827-2018.

Os resultados deste capítulo (exposição com 6-hidroxicriseno) serão publicados juntamente com os resultados da tese de Graciél Diamante (exposição com 2-hidroxicriseno) do departamento de Environmental Sciences da Universidade da Califórnia (USA).

ABSTRACT

The 2010 Deepwater Horizon disaster in the Gulf of Mexico was the largest oil spill in the United States history. Studies about the effects of oil pollution have been given high priority. In the marine environment oil can undergoes several weathering processes (biotic and abiotic) that alter its physical and chemical properties increasing its toxicity. Photodegradation may play an important role in oil breakdown in the marine environment with intense solar radiation and increased temperature conditions at surface waters. However, limited research has been performed on photochemical oxidation byproducts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) which can cause essentially toxicity effects on embryo-larval developmental stages. Among the PAH found in crude oil, chrysene is one of the most persistent in the water column and can undergo photo-oxidation to produce oxygenated derivatives such as 6-hydroxychrysene (6-OHCHN). In order to determine whether this type of injury extends to fishes exposed to hydroxylated compounds, we used zebrafish to compare the embryotoxicity and chrysene hydroxylated. Exposure to 6-OHCHN caused 65% increased in the incidence of cardiac deformities (pericardic edema) and 40% reduced embryo survival. We observed that 6-OHCHN can cause severe cardiotoxicity and photo-induced toxicity in zebrafish embryos mainly by misregulation of ionic transporters pathway in cardiac development. We also verified an increase in the fluorescence intensity in the yolk sac after treatment with 6-OHCHN compared to control, suggesting a bioaccumulation. Analyses of embryos exposed during different developmental stages (at 2, 5, 10 and 24 hours post fertilization) provided additional insight into sensitive time of these compound. These findings indicate that increased weathering of crude oil, which shifts the parental composition of chrysene to hydroxylated chrysene resulted in a greater toxic potency and a higher frequency of malformations. This study shows for the first time the regioselective impacts of hydroxylated PAH on cardiac development and survival of fish embryos by hydroxylated PAH. Our findings raise the need to identify mechanisms that are involved in the toxicity of these compounds to assess the potential risks of oil spills on fish populations.

Keywords: Oil spill; Fish development; Heart morphogenesis; heart gene;

RESUMO

O desastre da *Deepwater Horizon* 2010 no Golfo do México foi o maior derramamento de petróleo na história dos Estados Unidos. Os acidentes com petróleo representam uma grande ameaça para os organismos marinhos e, por conseguinte, os estudos dos efeitos da poluição por hidrocarbonetos são considerados prioritários. No ambiente, o óleo pode sofrer alterações estruturais decorrentes do intemperismo modificando os parâmetros físico-químicos, podendo causar um aumento de toxicidade. A fotodegradação pode desempenhar um papel importante na degradação do petróleo no ambiente marinho, entretanto, poucos estudos têm sido realizados sobre fotoprodutos resultantes da oxidação fotoquímica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Entre os HPA encontrados no petróleo bruto, o criseno é um dos mais persistentes na coluna de água e pode sofrer foto-oxidação para produzir derivados oxigenados como o 6-hidroxicriseno (6-OHCHN). Para determinar se este composto pode causar lesões aos peixes, utilizamos o peixe-zebra para investigar toxicidade gerada durante o seu desenvolvimento embrionário-larval. Observou-se que a exposição a 6-OHCHN pode causar um aumento em 65% na incidência de deformidades cardíacas (edema pericárdico) e 40% de redução na sobrevivência de embriões. Verificou-se também um aumento na intensidade de fluorescência no saco vitelínico após o tratamento com 6-OHCHN em relação ao controle, sugerindo uma possível bioacumulação deste composto. As análises de embriões expostos durante as diferentes fases de desenvolvimento (2, 5, 10 e 24 horas após a fertilização) mostraram que após 2 hpf era a fase mais sensível a este composto. Os resultados deste estudo indicam que o 6-hidroxicriseno possui maior toxicidade que o criseno, composto parental, provavelmente devido à posição seletiva da hidroxila. Verificou-se que a toxicidade cardíaca pode ser mediada via desregulação de transportadores iônicos (sódio e cálcio) nos tecidos em diferenciação. Esses resultados levantam a necessidade de identificar os mecanismos que estão envolvidos na toxicidade desses compostos para avaliar os riscos potenciais de HPA hidroxilados em populações de peixes.

Palavras-chave: derramamento de óleo; desenvolvimento de peixes; morfogênese do coração; genes cardíacos;

4.1 INTRODUÇÃO

O desastre da *Deepwater Horizon* (DWH) lançou mais de 636 milhões de litros de petróleo bruto no Golfo do México (GM) de 10 de abril a 14 de julho de 2010 e afetou uma área de habitats críticos para desova e criação de um grande número de espécies de peixes ecológica e comercialmente importantes. Além disso, o período do ano coincidiu com a janela de desova temporal de várias espécies de peixes (AROCHA et al., 2001; GRIMES et al., 1990; INCARDONA et al., 2014; LANG; GRIMES; SHAW, 1994). Este fato é agravado, visto que embriões de peixe são especialmente sensíveis à exposição ao óleo e seu alvo primário de ação tóxica é o coração em desenvolvimento (INCARDONA et al., 2013).

No meio marinho, o óleo pode sofrer intempéries que podem alterar sua composição física e química aumentando a toxicidade do óleo. Neste contexto, a fotodegradação pode desempenhar um papel importante na degradação do petróleo em um ambiente que sofre intensa radiação solar e condições de elevada temperatura, características encontradas no Golfo do México (INCARDONA et al., 2014; SAEED et al., 2011). A oxidação fotoquímica resulta na formação de fotoprodutos oxigenados com efeitos tóxicos maiores do que os compostos parentais ao ambiente marinho (SAEED et al., 2011). Estas moléculas, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os hidrocarbonetos heterocíclicos, podem absorver a energia de radiação e transferi-la para uma molécula de oxigênio, criando radicais de oxigênio capazes de danificar o DNA ou as membranas celulares através da peroxidação lipídica (SACO-ALVAREZ et al., 2008). Estudos concluíram que os produtos de foto-oxidação exercem efeitos adversos sobre as algas (LACAZE; VILLEDON DE NAÏDE, 1976), bactérias (PENGERUD et al., 1984), invertebrados marinhos e peixes (BERTILSSON; WIDENFALK, 2002).

Entre os HPA encontrados no petróleo bruto, o criseneno é um dos mais persistentes na coluna de água e pode sofrer foto-oxidação para produzir derivados oxigenados, tais como 6-hidroxicriseneno (6-OHCHN). O criseneno foi considerado o HPA mais estável na coluna de água oriundo o derramamento da DWH. Por meio de análises computacionais preditas, de acordo com as características de temperatura e pressão do Golfo do México, a meia-vida do criseneno nas águas rasas foi calculada em mais de dois anos e meio, enquanto nas águas profundas foi em quase cinco anos (TANSEL et al., 2011).

Entre os efeitos letais e subletais comuns dos HPA sobre animais marinhos estão o edema do saco vitelino e edema pericárdico, reduções da mandíbula, defeitos esqueléticos descritos como lordose ou escoliose (curvatura dorsal) e anormalidades no desenvolvimento do sistema nervoso (INCARDONA et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos de HPA hidroxilados (OHHPAs) em animais aquáticos. Estudos *in vitro* com células de levedura mostraram que os OHHPAs com 2 a 6 anéis podem estimular ou antagonizar a atividade do estradiol (HAYAKAWA et al., 2008). Neste contexto, alguns estudos observaram uma atividade estrogênica de 2-hidroxicriseno (2-OHCHN) possivelmente pela ligação ao receptor de estrogênio humano (hER) (VAN LIPZIG et al., 2005). Entretanto, o 6-OHCHN apresentou uma atividade antiestrogênica devido a ligação a um local antiestrogênico no receptor de estrogênio humano (hER) ou por mecanismos independentes do hER (TRAN et al., 1996). O estrogênio está criticamente envolvido em muitos processos celulares relacionados à reprodução, desenvolvimento, manutenção do sistema cardiovascular de vertebrados, entre outros (ALLGOOD JR. et al., 2013). A desregulação da via estrogênica pode, portanto, causar desenvolvimento anormal dos peixes, incluindo doenças cardiovasculares (INCARDONA et al., 2014).

Apesar destas análises e dos achados consistentes entre espécies, desconhecem-se os mecanismos precisos que conduzem a malformações associadas a exposição e metabolismo de HPA e muito menos decorrentes da exposição ao OHHPAs. No entanto, as proteínas contendo proteína 2 Hand2 e repetições ricas em leucina proteína (*LRCC10*) pode desempenhar um papel no desenvolvimento de embriões de peixe-zebra (KI-HYUN KIM, DAGMARA S. ANTKIEWICZ, LONG YAN, KEVIN W. ELICEIRI, WARREN HEIDEMAN, 2007). A proteína HAND2 parece controlar o miocárdio durante a diferenciação e morfogênese. Mutações deste gene produziram defeitos no desenvolvimento do miocárdio (STAINIER, 2001). Já o *LRRC10* possui papéis críticos na função cardíaca e patogênese cardíaca. Estudos recentes identificaram mutações do *LRRC10* em miocardiopatia humana (KI-HYUN KIM, DAGMARA S. ANTKIEWICZ, LONG YAN, KEVIN W. ELICEIRI, WARREN HEIDEMAN, 2007).

Alguns estudos demonstraram que a ativação destes genes poderia ser através da via estrogênica do receptor de estrogênio ligado à proteína G 1 (GPER). Devido à atividade antiestrogênica de 6-OHCHN, pode-se levantar a hipótese de que haja uma interação entre o 6-OHCHN com GPER na superfície da membrana, produzindo segundos mensageiros (Ca^{+2}), que por fim ativariam o fator de transcrição GATA4

e, posterior, regulação gênica de *HAND2* e *LRRC10*. A desregulação desses mensageiros secundários pode afetar importantes fatores de transcrição que regulam genes críticos para o desenvolvimento cardíaco (Figura 25).

Em peixe-zebra, foram atribuídas funcionalidades a um grande número de genes relacionados com formação de praticamente todos os órgãos com base na mutagênese de genes-alvos específicos (HAFFTER et al., 1996). Consequentemente, os fenótipos resultantes da perda da função do gene através da mutação podem ser associados a malformações resultantes da exposição embrionária a contaminantes. Esta abordagem "genética química" vem sendo usada para identificar mecanismos específicos na embriotoxicidade (PETERSON, 2001).

Assim sendo, utilizando o peixe-zebra como modelo animal, os objetivos deste estudo foram: determinar os efeitos de 6-hidroxicriseno no desenvolvimento de embriões de peixe-zebra e compreender o mecanismo molecular subjacente a qualquer malformação no desenvolvimento induzido por 6-hidroxicriseno. Os resultados aqui apresentados levantam a necessidade de identificar mecanismos que estão envolvidos na toxicidade desses compostos para avaliar os riscos potenciais da exposição de HPA hidroxilados nas populações de peixes.

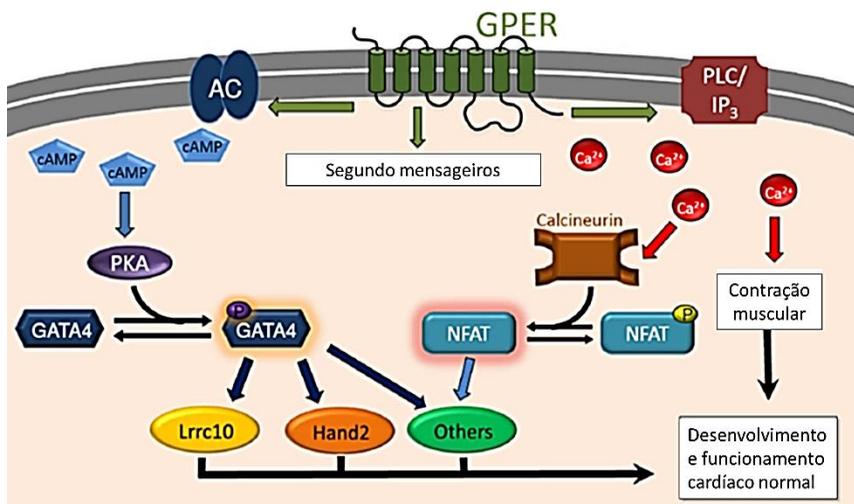


Figura 25. Mecanismo molecular hipotético testado nesse estudo por meio da via estrogênica não clássica através da ativação de receptor de estrogênio ligado à proteína G (GPER), desregulação de genes cardíacos e posterior malformação fenotípicas cardíacas.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos de 6-hidroxicriseno em embriões de *Danio rerio* visando compreender o mecanismo molecular associado ao desenvolvimento de malformações.

4.2.2 Objetivos Específicos

Determinar os efeitos de 6-hidroxicriseno em embriões de peixe-zebra após 74h de exposição:

- Verificar os estágios de desenvolvimento mais sensíveis à exposição a 6-hidroxicriseno;
- Realizar ensaios toxicológicos com intuito de caracterizar as respostas por 6-hidroxicriseno no desenvolvimento de embriões de peixe-zebra;
- Compreender o mecanismo molecular em resposta à exposição de 6-hidroxicriseno;

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Animais

Peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos e selvagens (5D) foram mantidos em um ciclo luz: escuro de 14 h:10 h e acondicionados em água de média dureza com temperatura de 27°C no laboratório de Toxicologia Aquática da Universidade da Califórnia, Campus Riverside/ USA. As fêmeas e os machos adultos foram criados separadamente até o período de reprodução e alimentados duas vezes por dia com larvas de *Artemia salina* vivas. Ao alcançar o período reprodutivo, os peixes foram colocados no mesmo aquário, na proporção de três fêmeas para dois machos, com sistema de armadilhas suspensas para permitir que os ovos fossem depositados no fundo do aquário. Os embriões foram coletados no tempo zero e 1 h após a fertilização (hpf). Todos os peixes foram tratados de acordo com os protocolos institucionais do Comitê de Uso e Cuidados de Animais Institucionais na Universidade de Riverside, Califórnia.

4.3.2 Ensaio de sensibilidade ao 6-hidroxicriseno (6-OHCHN)

Para identificar os estágios do desenvolvimento mais sensíveis à toxicidade induzida por 6-hidroxicriseno (6-OHCHN \geq 99% purity, MRI Global, Kansas City, MO) os embriões foram expostos nas concentrações de 0,5 μ M e 5 μ M de 6-OHCHN nas diferentes fases do desenvolvimento de embriões de peixe-zebra, de acordo com (KIMMEL et al., 1995) (Figura 26). Os embriões foram coletados e analisados sob microscópio de luz (\times 0,67-6,7, Olympus, Japão) para averiguação do estágio de desenvolvimento específico para exposição, em seguida, os peixes foram incubados em água contendo 6-OHCHN ou veículo (0,1 % etanol) em condições de exposição estática de renovação. As fases de desenvolvimento selecionadas nesse estudo foram: (i) Início do período da blastulação (2,25 até 5,25 hpf): os embriões foram expostos com 2 horas após fertilização (hpf) contendo 64 células marcando o início da blástula; (ii) Início do período gastrulação (5,25-10 hpf): embriões foram expostos com 5,25 hpf; (iii) Início da segmentação (10-24 hpf): embriões foram expostos com 10 hpf; (iv) Início do período de farínghula (24 - 48 hpf): os embriões foram coletados e expostos com 24 hpf (Figura 26). Para todos os estágios, a exposição ocorreu por 74 h dentro da incubadora de luz (14h: 10 h de luz: ciclo escuro) e temperatura controlada (27 °C). Em seguida, a porcentagem de sobrevida e de deformidades foi quantificada em microscópio óptico (\times 0,67-6,7, Olympus, Japão)

sobretudo morfologia cardíacas após tratamento. O tempo de 74h de exposição foi selecionado devido às respostas moleculares produzidas em embriões de peixes zebra tratados previamente com 17β -estradiol (manuscrito em preparação pelo mesmo grupo de pesquisa). As concentrações de exposições também foram baseadas nas respostas de estudos prévios realizados com 2-hidroxicriseno (manuscrito em preparação).

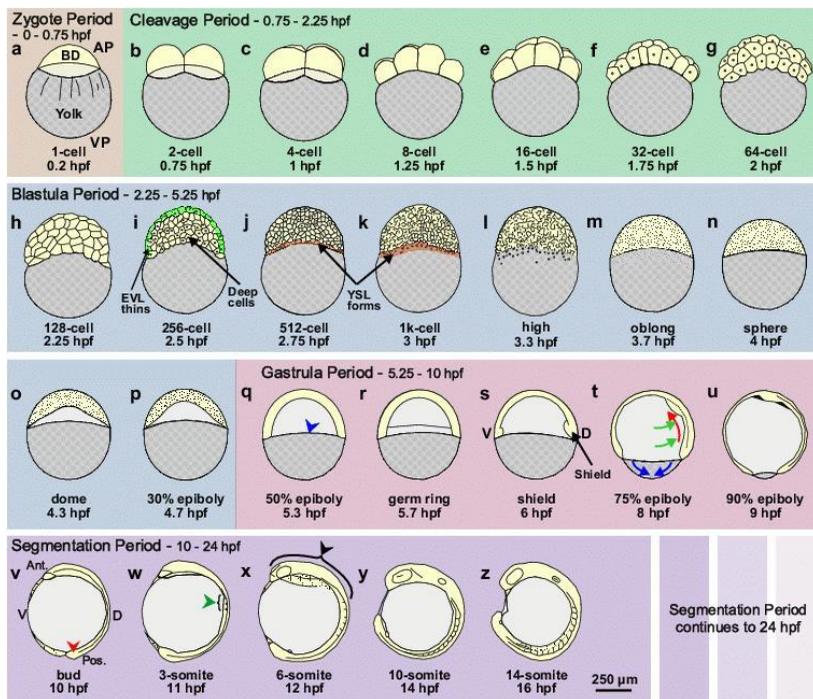


Figura 26. Estágios do desenvolvimento do peixe-zebra. FONTE: < <http://www.devbio.biology.gatech.edu> >.

4.3.3 Ensaio de exposição e desenho experimental

Os embriões com morfologia externa esperada para a espécie foram determinados com base no estágio de desenvolvimento descrito em KIMMEL et al. (1995) após 2 hpf. Os embriões não viáveis foram descartados. Embriões viáveis foram colocados em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo 0,1% de etanol (veículo) ou 6-OHCHN, sendo 30-35

embriões por repetição e 5-10 repetições por grupo. Os embriões foram tratados com concentrações nominais de 6-OHCHN (0,5 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 8 μ M) expostos durante 74h dentro da incubadora de luz (14 h: 10 h de luz: ciclo escuro) e temperatura controlada (27 °C). Após exposição, os embriões foram lavados e transferidos para novas placas de Petri contendo água doce onde foram avaliados quanto a deformidades sob microscópio óptico, imediatamente congelados e armazenados a -80 °C para análise de transcrição gênica por qRT-PCR.

4.3.4 Ensaio de toxicidade embrio-larval

O ensaio de toxicidade embrionária e larval do peixe-zebra foi adaptado de Farwell et al. (2006). Os embriões (2 hpf) foram coletados e tratados como descrito anteriormente com três repetições sendo 30 - 35 embriões por placa. Após 74 horas de tratamento com 6-OHCHN, os embriões foram lavados e transferidos para novas placas de Petri contendo água doce nova. A água foi trocada a cada dois dias e os peixes foram monitorados até 7 dias após a fertilização (dpf). Logo após, os embriões foram avaliados quanto às deformidades e mortos imediatamente. Os dados de sobrevivência e deformidades foram registrados.

4.3.5 Extração de RNA total, síntese de cDNA e desenho de iniciadores

O RNA total de embriões de 76 hpf (N= 7, sendo 35 embriões por replicata por tratamento) foi isolado utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante com pequenas modificações. Cada extração continha 0,1 mg de *pool* de animais (N = 35 embriões) que foi homogeneizado com Qiazol utilizando um homogeneizador de pistilos de polipropileno azul estéril. Após homogeneização, os tubos contendo o homogeneizado foram mantidos a temperatura ambiente durante uma hora. Clorofórmio foi adicionado ao homogeneizado de modo a separar as fases aquosa e orgânica por centrifugação. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado por adição de 100% de isopropanol, depois foi sedimentado e lavado com 75% de etanol. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em água livre de RNAase. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas em um espectrofotômetro NanoDrop® ND-2000 UV-Vis (Thermo Scientific). Apenas amostras de alta pureza (OD 260 / 280 > 1,8; OD 260 / 230 > 1,8) foram imediatamente armazenadas a -80°C para análise posterior. A

integridade do RNA foi verificada através da análise em eletroforese em gel de agarose a 1,0 %. Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando o *Reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, WI) e armazenados a -20°C.

O software Primer Quest® foi usado para desenhar os iniciadores por meio da plataforma *Integrated Technologies de DNA* (IDT) acessada no endereço eletrônico <<https://www.idtdna.com/Scitools>> e otimizada pelo programa PCR Miner 22 <<http://miner.ewindup.info/>>. Os iniciadores utilizados neste estudo estão listados na Tabela 6. Em seguida, as sequências dos iniciadores foram submetidas ao programa *Primer-BLAST* no *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) contra o banco de sequências não redundantes (nr database) de *D. rerio* (Hamilton, 1822) (taxid:7955) (*e-value* de 10^{-6}). Os parâmetros utilizados foram: tamanho do produto amplificado 70–150 bp, temperatura de fusão 58 – 62 °C, tamanho dos iniciadores de 20 – 26 bp e porcentagem de GC 40 – 60%. A detecção de dímeros foi avaliada por meio do programa FastPCR (KALENDAR; LEE; SCHULMAN, 2014).

4.3.6 Análises de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A análise de qRT-PCR foi realizada com 35 embriões por replicata por tratamento (N=7). De acordo com as instruções do fabricante, aproximadamente 100 ng de cDNA foram amplificados por qRT-PCR em duplicata utilizando o termociclador MyiQ5 (Biorad). Realizou-se qRT-PCR com volume de reação de 20 µL contendo: 10 µL de SYBR Green de Bio-Rad (Promega), 1 µL de cada iniciador (1 µM) e 2 µL de cDNA (100 ng). A amplificação de qRT-PCR foi realizada utilizando o programa de ciclagem rápido de três passos como se segue: 3 min a 95°C e 40 ciclos de 10s a 95°C e 30s a 55°C. Os produtos de qRT-PCR foram sujeitos a uma análise da curva de fusão entre 65 e 85°C com incremento de 0,5°C e medição contínua de fluorescência para assegurar que ligações inespecíficas estavam ausentes nas amostras.

Determinou-se a eficiência de qRT-PCR (E) utilizando o software <<http://miner.ewindup.info/>>, $R^2 > 0,99$ e eficiências entre 95 e 105%. Os valores de limiar de ciclo (Ct) corresponderam ao número de ciclos em que a emissão de fluorescência foi monitorada em tempo real que excedeu o limiar do nível basal da fluorescência. Os Cts foram obtidos através do software iQ5™ (BioRad). Em seguida, os dados de Ct foram analisados de acordo com SCHMITTGEN; LIVAK (2008)

deltadelta CT comparando-se controles e tratados (76 hpf) para avaliar quantitativamente a transcrição gênica.

4.3.7 Ensaio de co-exposição com G-15 e 6-OHCHN

O ensaio de co-exposição com G-15 foi baseado no protocolo descrito em (JAYASINGHE; VOLZ, 2012) G-15 (4- (6-bromo-benzo [1,3] dioxol-5-il) -3a, 4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta [c] quinolina) foi adquirido na Tocris Bioscience (Ellisville, MO). As soluções estocadas de G-15 foram preparadas por dissolução em 100% de etanol de alto desempenho para cromatografia líquida. Todas as soluções-estoque foram armazenadas a 4° C. Para cada experimento, as soluções de trabalho foram preparadas frescas, em concentração nominal de 0,12 % de etanol para grupos controles e tratados. Imediatamente após a desova (0-1 pós-fertilização), os ovos recém-fertilizados foram coletados e colocados em grupos de aproximadamente 30 - 35 por placa de Petri dentro de uma incubadora de luz (14 h: 10 h de luz: ciclo escuro) e temperatura controlada (27 °C) até 2 hpf onde foram tratados. Os embriões viáveis foram continuamente expostos à 6-OHCHN, ao controle (0,12 % de etanol) ou G-15 (5 µM) por 74 h nas placas de Petri e incubados sob mesmas condições descritas acima. Para avaliar o impacto da co-exposição ao G-15, os embriões foram expostos separadamente da seguinte maneira: 0,12 %, etanol, 5 µM de G-15, 5 µM de 6-OHCHN, 5 µM de 6-OHCHN co-exposto com G15. Logo após a exposição por 74 h, as avaliações morfológicas externas foram observadas utilizando um microscópio (0,67×-6,7, Olympus, Japão). Esse experimento de co-exposição foi realizado em seis réplicas independentes e separadas.

4.3.8 Avaliação de 6-OHCHN em embriões de *peixe-zebra*

A bioacumulação do 6-hidroxicriseno em embriões de peixe-zebra foi analisada após exposição por 26h, 50h e 74h na presença de 6-OHCHN em comparação com 0,12% de etanol. Após o tratamento, os embriões foram lavados, anestesiados com metanossulfonato de tricaina (MS-222; 0,1 mg / L) e imediatamente visualizados e documentados utilizando um estereomicroscópio Olympus MVX10 MacroView equipado com uma Olympus DP72 Digital Color Camera e Olympus DP2-BSW Imaging Software. A intensidade de fluorescência foi quantificada no saco vitelínico de cada embrião usando o *software* Imagem J 1.50D (Wayne Rasband, EUA). A média e o desvio padrão da

Tabela 8. Sequências iniciadoras, números de acesso (NCBI) e tamanho do produto amplificado (*amplicon*).

Nome do gene	Número de Acesso no NCBI	Sequência de iniciadores 5'-3' (senso, antisenso)	Tamanho do produto da PCR (pb)
Genes cardíacos			
<i>LRRC10</i> <i>Leucine Rich Repeat Containing 10</i>	NM_001009559.1	S:AGGAGCTTCCTCTGGTCATA A:AGCCTAAATGGAGCGTCTTG	195
<i>HAND2</i> <i>Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2</i>	NM_131626.3	S:AGAGATGTCTCCTCCTGACTATAC A:TCCCCTGAGTTCTGCAAAGG	214
<i>GP1B1</i> <i>G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1</i>	NM_001128723.1	S:TGGCTGTGGCAGATCTTATTC A:CAATGGACTGCTGCTCATAGA	203
<i>GATA4</i> <i>Transcription factor GATA-4</i>	NM_131236.2	S:CGGATACCGCAACTTATTCA A:GTCCAAGAGGCTCCGATATTA	112
<i>CAMK2A</i> <i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha</i>	NM_001017741.2	S:GTTCTCTCAGGGCAAGAGTAT A:CCCGTTACTAGGTCAAAGATGAG	185
Transporte iônico			
<i>KCNH2A</i> <i>Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2a</i>	NM_001042722.1	S:CCAGGCAGAGACATCAACAA A:CTGAGCCTTATCTTCCCAGAAC	258
<i>NCX1</i> <i>Solute Carrier Family 8 Member A1 (slc8a1a)</i>	NM_001037102.1	S:CAGGGTAGAGACAAACCAATCC A:CAGCAATACGCCTCTCATCTT	103

Resposta à proteína mal enovelada					
<i>BIP</i>	<i>Heat shock protein 5 (hspa5)</i>	NM_213058.1	S:GGAGGATTCTGACCTGAAGAA A:GGTGACAGTAGGCTGGTTATC	349	
<i>RYR2B</i>	<i>Ryanodine receptor 2b (cardiac)</i>	XM_009300703.1	S-CCAAGCTTCTGAACTGCTTTG A-CATGTAGCCACTGTTCTCCTTC	245	
Gene normalizador					
<i>EF-1 alfa</i>	<i>Elongation factor-1 alpha</i>	NM_001039985.1	S-CTACATAAGAAGATCGGCTACAA A-CGACAGGGACAGTTCCAATAC	266	

intensidade de fluorescência foram relatados como uma variação em relação ao grupo controle.

4.3.9 Transativação do receptor de hidrocarboneto de arila (AhR)

Com o objetivo de verificar a transativação do receptor de hidrocarboneto de arila (AhR) pelo 6-OHCHN, foi realizado um ensaio com linhagem celular GeneBLAzer® CYP1A1-bla LS-180 (Invitrogen) que contém um gene repórter beta-lactamase, cuja transcrição é induzida pelo promotor CYP1A1. O protocolo seguiu as instruções do fabricante. As células CYP1A1-bla LS-180 cresceram em meio mínimo essencial (do inglês Minimum Essential Medium - MEM, Invitrogen, EUA) a 37°C em atmosfera úmida e saturação de 5% de CO₂ / 95% de ar. O meio de cultivo foi renovado a cada três ou quatro dias com sub-cultivos. A viabilidade celular foi medida utilizando o método MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (Promega), a fim de verificar as concentrações não-letais às células de 6-OHCHN. Em seguida, as células foram lisadas a partir de meio de crescimento utilizando solução de 0,05% de tripsina e centrifugadas a 1.450 rpm durante 5 min. As células, então, foram semeadas em placas de 96 poços (Corning®) (aproximadamente 40.000 células / poço) contendo meio de ensaio Opimem TM I (Promega) com 1% de DMSO durante 24 h. Adicionou-se 6-OHCHN nas concentrações variáveis de 0,0015 µM a 10 µM e, utilizou-se como padrão o composto tetraclorodibenzodioxina 2,3,7,8 (TCDD). Após 24h de incubação nas condições citadas acima, utilizou-se 1 mL de lisado celular para medir a atividade dos compostos como indutores de CYP1A1 em placa de 96 poços, utilizando 1 mM de LiveBLazer™ FRET- B/G como leitura. As medições foram realizadas no leitor de microplaca com multidetecção de Luminescência/Fluorescência LUMIstar Omega (BMG LABTECH) utilizando o software Glomax (Promega). Cada poço foi medido em intervalos de 10s iniciando 1s após injeção do substrato com filtro de excitação azul (409/20 nm) e filtro de emissão azul/verde (460/40 nm, 530/30 nm).

4.3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico GraphPad. Para as avaliações de sobrevivência e deformidade, toxicidade larval e qRT-PCR foram analisadas as diferenças significativas entre tratamentos usando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de

Dunn ($p < 0,05$) para identificar efeitos de tratamento significativos em comparação com controles (etanol a 0,1%).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Toxicidade induzida por 6-OHCHN

Embriões com 2 hpf apresentaram uma diminuição de aproximadamente 40 % na sobrevivência quando tratados com 6-OHCHN (Figura 27A). O tratamento com 5 μ M de 6-OHCHN mostrou um aumento significativo na percentagem de deformidades de aproximadamente 45% nos embriões tratados em 2hpf, 5hpf e 24hpf (Figura 27B).

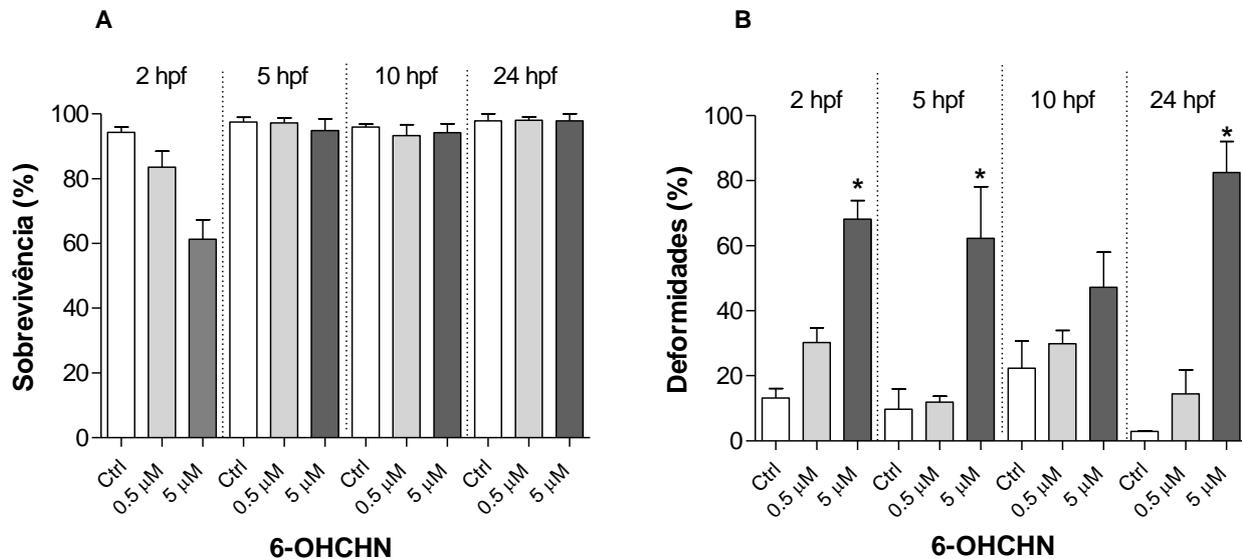
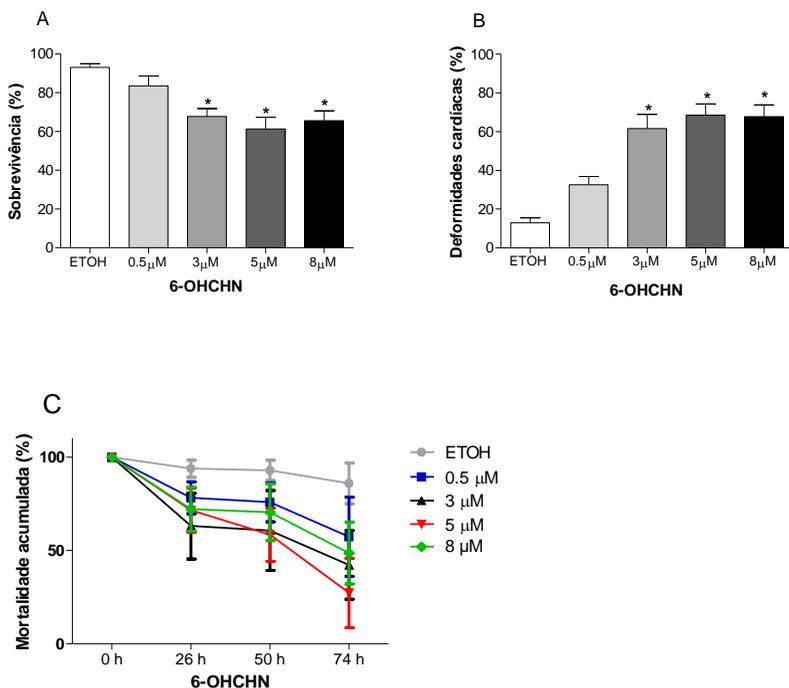


Figura 27. Efeitos do 6-OHCHN nos diferentes estágios de desenvolvimento de peixes-zebra. Percentagem de sobrevivência (**A**) e deformidades cardíacas (**B**) após tratamento com 0,5 μM e 5 μM 6-OHCHN por 74 h e 0,12% etanol nos estádios de desenvolvimento de 2 hpf, 5 hpf, 10 hpf e 24 hpf. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle de cada estágio de desenvolvimento (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

4.4.2 Ensaio de Toxicidade

A sobrevivência de embriões reduziu 40% (2hpf) após tratamento com 3, 5 e 8 μM de 6-OHCHN (Figura 28A), enquanto as deformidades cardíacas em embriões tratados aumentaram em 45% nas concentrações de 3, 5 e 8 μM de 6-OHCHN. 26 hpf de tratamento mostrou maior número de mortalidade acumulada de peixe-zebra em comparação com outros períodos de exposição (50 e 74 hpf). Os valores de LC50 e EC50 de 6-OHCHN foram de $\pm 1,14 \mu\text{M}$ e $\pm 1,30 \mu\text{M}$, respectivamente após 74h de exposição (dados não apresentados). Os embriões tratados com 6-OHCHN apresentaram deformidades moderadas em todos os tratamentos (Figura 28B, D). As deformidades mais comuns observadas foram edema pericárdico (PE) e edema no saco vitelino (YE) (Figura 28D).



Continua na próxima página

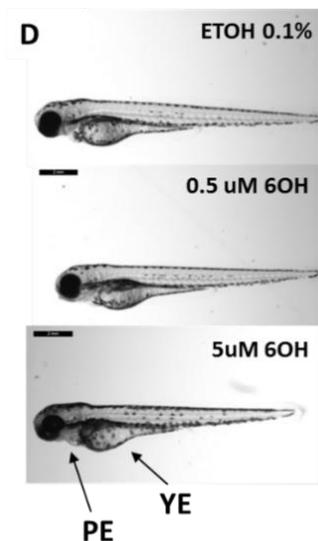


Figura 28. Efeitos de 6-OHCHN na sobrevivência e deformidade cardíaca em embriões de peixe-zebra (2 hpf). Percentagem de sobrevivência (A) e percentagem de deformidades cardíacas (B) após 74h de tratamento nas concentrações de 0,5, 3, 5 e 8 μM de 6-OHCHN e 0,1% de etanol. (C) Mortalidade acumulada de embriões de peixe-zebra tratados com 6-OHCHN após 26, 50 e 74 h. (D) Deformidades fenotípicas embriões de peixe-zebra tratados com 6-OHCHN por 76hpf. PE: edema pericárdico induzido por 6-OHCHN; YE: edema do saco vitelino.

4.4.3 Ensaio de toxicidade embrionária e larval

Foi observada uma sobrevivência de aproximadamente 10% dos embriões no quarto dia após a exposição a 5 μM de 6-OHCHN (Figura 29). Os peixes foram tratados por 74h e em seguida foram transferidos para água doce por mais três dias. No sétimo dia a grande maioria dos peixes observados apresentou deformidades significativas (dados não mostrados).

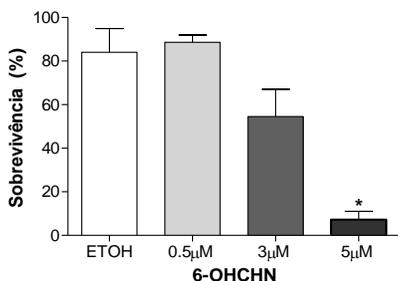


Figura 29. Efeitos de 6-OHCHN na sobrevivência de peixe-zebra após exposição por 76 hpf seguida de transferência para água limpa por mais três dias. Percentagem de sobrevivência após 74h de tratamento com 0,5 e 5 µM de 6-OHCHN e 0,1% etanol. Asterisco indica diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

4.4.4 Análise da transcrição de genes cardíacos

Nenhuma alteração significativa foi observada na transcrição do gene que codifica a proteína com repetição rica em leucina 10 (*LRCC10*) (Figura 30A). A transcrição do gene receptor de estrogênio acoplado à proteína G (*GPER*) não alterou significativamente nos animais tratados com a maior concentração de 6-OHCHN ($p = 0,119$) (Figura 30B). A transcrição do gene fator de transcrição *GATA4* aumentou significativamente após o tratamento com 5 µM de 6-OHCHN (30 vezes, $p = 0,029$) (Figura 30C). Nenhuma alteração nos níveis de mRNA do gene do cálcio calmodulina cinase (*CAMK*) foi observada nos grupos tratados com 6-OHCHN (Figura 30D).

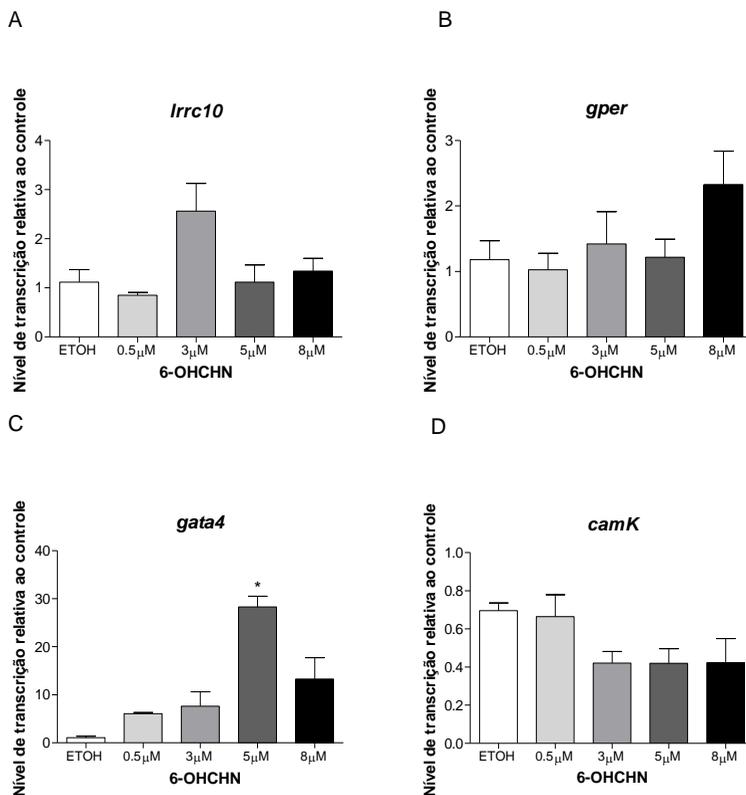


Figura 30. Efeitos de 6-OHCHN na expressão gênica de LRRC10, GPER, GATA4 e CAMK em embriões de peixe-zebra. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

4.4.5 Análise da transcrição de genes transportadores de íons

A transcrição do gene transportador de sódio / cálcio 1 (*NCX1*) reduziu significativamente com 5 μ M de 6-OHCHN (0,5 vezes, $p = 0,0050$) em relação ao grupo exposto a 3 μ M de 6-OHCHN, enquanto a transcrição do gene transportador de potássio (*KCHN2A*) foi menor nos embriões expostos a 6-OHCHN nas concentrações (5 μ M) ($p = 0,029$) (Figura 31).

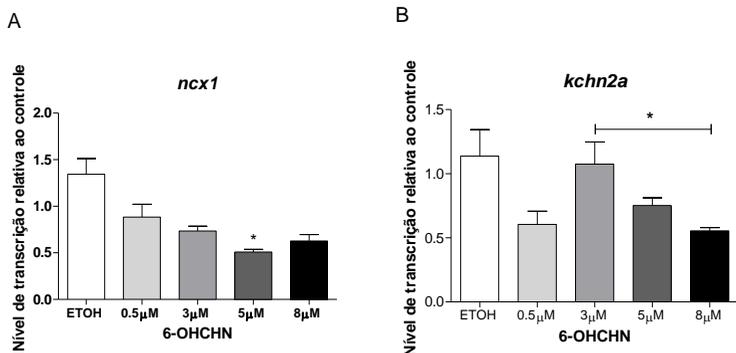


Figura 31. Efeitos de 6-OHCHN na expressão de gênica de *NCX1* e *KCHN2A* em embriões de peixe-zebra. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

4.4.6 Análise da transcrição de genes em resposta às proteínas mal enoveladas

Nenhuma alteração significativa na expressão do gene que codifica a proteína de choque térmico HSP70 (*BIP*) ou receptor de ryanodina (*RYR*) foi observada nos embriões tratados com 6-OHCHN (Figura 32 A-B).

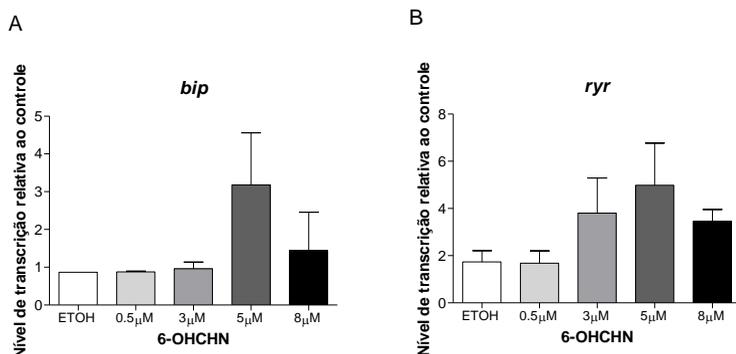


Figura 32. Efeitos de 6-OHCHN na expressão gênica *BIP* e *RYR* em embriões de peixe-zebra. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

4.4.7. Co-exposição com G-15 e 6-OHCHN

Para avaliar o potencial de interação entre 6-OHCHN e GPER durante a embriogênese, realizou-se a co-exposição seletiva do antagonista GPER (G-15) e 6-OHCHN ambos nas mesmas concentrações de tratamento de 5 μM durante 74 h. Observou-se que a porcentagem de sobrevivência diminuiu quando foi adicionado G-15 à co-exposição com 6-OHCHN (Figura 33A). O percentual de deformidades também aumentou no grupo exposto a G-15 em conjunto com 6-OHCHN (Figura 33B).

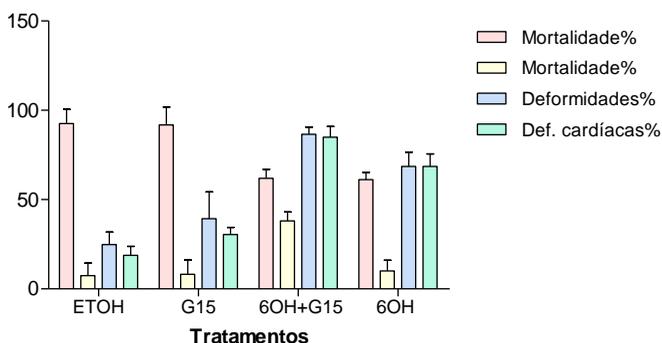


Figura 33. Percentagem de sobrevivência e de deformidades em larvas de peixe-zebra após 76hpf tratadas com o antagonista seletivo do GPER (G-15) juntamente ao 6-OHCHN. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo exposto e controle (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

4.4.8 Transativação do receptor de hidrocarboneto de arila (AhR)

Para avaliar o potencial de 6-OHCHN em atuar como modulador de AhR, células GeneBLazer® CYP1A1-bla LS-180 foram expostas com 6-OHCHN e posteriormente foi avaliada a atividade da luciferase indicativa da indução gênica de CYP1A1. Nenhuma diferença significativa na quantidade de sinal de luciferase entre os tratamentos no ensaio de AhR foi observada (Figura 34).

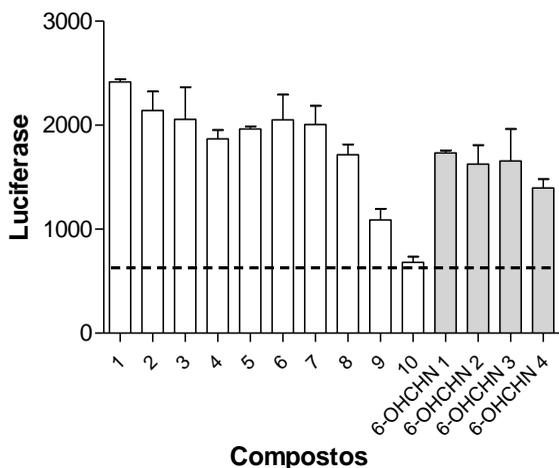


Figura 34. Avaliação da ligação de 6-OHCHN a AhR em embriões de peixe-zebra (76 hpf). Os números 1 a 9 representam o controle positivo do ensaio de células com tetraclorodibenzodioxina 2,3,7,8 (TCDD), seguida pelas diferentes repetições de 6-OHCHN (0,0015 μ M a 10 μ M).

4.4.9 Avaliação de 6-OHCHN em embriões de peixe-zebra

Para avaliar o potencial de bioacumulação de 6-OHCHN em embriões de peixe-zebra, os embriões (2 hpf) foram expostos durante 74 h com 5 μ M de 6-OHCHN por 26, 48 e 76 hpf e avaliados usando estereomicroscópio de transmissão. Verificou-se que a intensidade de fluorescência aumentou durante o tratamento de exposição o que indica que 6-OHCHN é possivelmente bioacumulado durante a exposição (Figura 35).

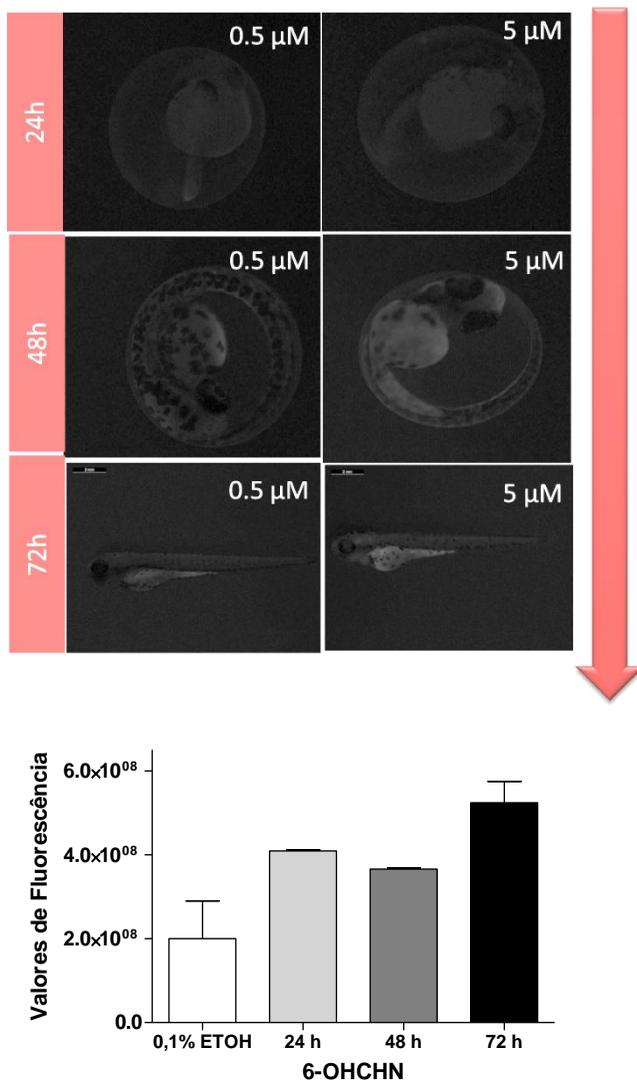


Figura 35. Avaliação fluorimétrica de peixe-zebra no estágio embrionário e larval após exposição ao composto 6-OHCHN por 76hpf. As visualizações foram feitas com estereomicroscópio Olympus MVX10 MacroView acoplado com Olympus DP72 Digital Color Camera. A intensidade de fluorescência foi quantificada em cada embrião usando o software Imagem J 1.50D.

4.5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram que a exposição de embriões de peixe-zebra a HPA parentais produziram alterações fenotípicas como disfunção cardíaca (por ex., batimentos cardíacos reduzidos) e alterações morfológicas (por ex., *looping* cardíaco defeituoso), bem como defeitos na linha lateral de peixes (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004). Entretanto, elevadas concentrações de criseno (8,8 μM) não mostraram nenhum efeito aparente em embriões de peixe-zebra (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004). O presente estudo mostra evidências de que a exposição de embriões de peixe-zebra ao criseno hidroxilado (6-OHCHN) resultou em toxicidade gerando lesões cardíacas tipicamente causadas por petróleo bruto ou HPA parentais. A posição seletiva do grupo hidroxila na molécula de criseno pode estar relacionada com sua toxicidade, pois embriões expostos a 2-OHCHN apresentaram um aumento na taxa de deformidades no pericárdio e maior bioacumulação em comparação com 6-OHCHN em peixe-zebra (manuscrito em preparação).

Os resultados aqui apresentados sobre os efeitos de 6-OHCHN fornecem evidências adicionais sobre os fenótipos gerados da exposição e no desenvolvimento de peixe-zebra, o qual se divide em duas categorias: (1) deformidades cardíacas e potencialmente comprometimento da função cardíaca; (2) outros efeitos (por ex. edema do saco vitelino). A exposição de 6-OHCHN acarretou em edema pericárdico moderado nos estádios de desenvolvimento entre 2 hpf e 76 hpf. O edema ou acumulação de líquido encontrado ao redor do coração pode ser um indicador da interrupção da função cardiovascular durante a morfogênese cardíaca (POLLINO; HOLDWAY, 2002), desta forma, o edema pericárdico pode ser responsável pela mortalidade do embriões expostos direta ou indiretamente. Vale ressaltar que o coração é o primeiro órgão a se formar e a funcionar durante a embriogênese dos vertebrados, sendo considerado como um vaso sanguíneo contrátil coberto com uma camada muscular externa (miocárdica) e uma camada endotelial interna (endocárdica) (STAINIER, 2001). Em peixes, o coração em desenvolvimento é conhecido como um órgão-alvo sensível para os efeitos tóxicos de HPA de dois a seis anéis aromáticos que compõem o petróleo bruto (FRAYSSE; MONS; GARRIC, 2006). Os compostos com três anéis são os mais abundantes no petróleo bruto e podem causar disfunção cardíaca em peixes, interferindo assim nos processos dependentes de circulação bem como na morfogênese cardíaca. Além disso, o intemperismo provoca alterações na composição de HPA,

resultando em uma maior toxicidade e maior frequência de malformações (INCARDONA et al., 2014). Nesse trabalho foi observado que o 6-OHCHN, composto com quatro anéis aromáticos cíclicos, causou 40% de mortalidade e 45% de deformidades cardíacas nos embriões expostos a 2 hpf.

A sobrevivência dos peixes após exposição aos HPA é controversa. Heintz et al. (1999) mostrou que embriões de salmão expostos a petróleo bruto e liberados como juvenis no ambiente aquático, retornaram do mar como adultos em números significativamente menores. Isso porque possivelmente os animais sobreviventes após a exposição em ambientes contaminados com concentrações subletais de HPA apresentaram maior susceptibilidade a doenças, parasitismo ou predação (HEINTZ; SHORT; RICE, 1999). Outros estudos mostraram que embriões de peixe-zebra expostos a concentrações subletais de óleo diesel conseguem sobreviver até a idade adulta, embora as mudanças permanentes da morfologia do coração tenham causado uma redução no desempenho da natação (LEWIS; POOK; GALLOWAY, 2008). Verificou-se ainda que após um período de exposição a HPA de três anéis (fenantreno e dibenzotiofeno), seguida de transferência para água limpa, larvas poderiam se recuperar das deformidades com regeneração cardíaca. Muito embora a disfunção cardíaca provocada seja reversível com deformidades transitórias e sutis, sugere-se que as exposições nos estágios de desenvolvimento iniciais podem se tornar severas em estágios posteriores do desenvolvimento cardíaco (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004) e provavelmente reduzirão a sobrevivência dos peixes em estágios de vida larval, juvenil ou adultos (INCARDONA et al., 2013). No presente estudo, verificou-se que após a transferência para água limpa em até 7 dpf, observou-se mortalidade de 60% nos peixes tratados com 6-OHCHN. Esse composto com quatro anéis uma vez hidroxilado provoca danos cardíacos severos e possivelmente irreversíveis em embriões quando expostos a 2 hpf.

A natureza responsiva de embriões ou larvas é ainda maior quando se trata da bioacumulação e concentração de poluentes orgânicos (AEPPLI et al., 2012). Devido ao seu alto conteúdo lipídico, a bioacumulação de xenobióticos (especialmente HPA) ocorre no saco vitelínico de embriões. Acredita-se que o processo de absorção do saco vitelínico seja um fator importante na redistribuição de xenobióticos que resultem em efeitos tóxicos em estágios de desenvolvimento posteriores (PETERSEN; KRISTENSEN, 1998). A bioacumulação de HPA radiomarcados em embriões e larvas de peixe-zebra foi avaliada por Petersen & Kristensen (1998) e mostrou que o naftaleno e o fenantreno

acumularam após 24 - 30 h de tratamento com valores entre 7 - 8 mmol / kg de peso seco para embriões e 4 - 5 mmol / kg para larvas, respectivamente. Contudo, HPA de quatro anéis aromáticos radiomarcados atingiram níveis de aproximadamente 3 mmol / kg de peso seco. Com base nos valores de coeficiente de partição ($\log K_{ow}$) e fatores de bioconcentração determinados para peixe-zebra previamente publicados (PETERSEN; KRISTENSEN, 1998) foi estimado que 6-OHCHN tenderia a ser bioacumulado em embriões. Nesse estudo foi observado um aumento na intensidade da fluorescência durante a exposição por 6-OHCHN em 24, 48 e 72h de maneira concentração-dependente. A bioacumulação dos compostos de 6-OHCHN no saco vitelínico pode estar relacionada ao desenvolvimento de deformidades e na redistribuição de 6-OHCHN mantendo-o em concentrações elevadas nos estágios embrio-larvais. Entretanto, devido às limitações técnicas na detecção de HPA hidroxilados, não foi possível quantificar precisamente o composto 6-OHCHN. Com o uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GS-MS) ou marcação radioativa será possível avaliar com mais precisão os níveis de 6-OHCHN no saco vitelínico de embriões peixe-zebra.

Em 1996, uma série de artigos relatou a identificação de centenas de mutações que afetam o desenvolvimento do embrião de peixe-zebra, sobretudo, os genes relacionados com o desenvolvimento cardíaco (SØRHUS et al., 2016). Dentre as mutações descritas, foram relatados genes relacionados com a diferenciação do miocárdio (*GATA4* e *HAND2*) e endocárdio, os quais formarão as válvulas cardíacas (STAINIER, 2001). Entre os genes relacionados com a diferenciação e migração de células dos tecidos em formação ao longo do desenvolvimento está o gene *HAND2* que codifica o fator de transcrição bHLH. O gene *HAND2* parece regular tanto a diferenciação como a morfogênese das células miocárdicas e na formação da câmara cardíaca. Apesar do seu papel crucial na formação do coração, não verificamos diferenças significativas na expressão deste gene. Outro fator de transcrição avaliado nesse estudo e que parece desempenhar um papel importante na diferenciação do miocárdio é o gene *GATA4* (STAINIER, 2001). Observou-se a indução de transcritos de *GATA4* em até 30 vezes em embriões expostos a 5 μ M de 6-OHCHN, porém, a transcrição não respondeu de maneira dose-dependente.

Os transportadores de cálcio e potássio desempenham um papel crucial na correta função do coração embrionário e são suscetíveis à exposição por HPA (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004; SØRHUS et al., 2016). Estudos recentes demonstraram que a exposição

ao petróleo bruto afeta o desenvolvimento cardíaco interrompendo o mecanismo de acoplamento excitação-contração. Acredita-se que ocorra um mecanismo de esgotamento do cálcio intracelular por hidrocarbonetos derivados do petróleo bruto perturbando várias vias críticas da organogênese em peixes. Além disso, foi observado que o transporte de cálcio pode estar relacionado à deformidades craniofaciais em peixes (SØRHUS et al., 2016). Neste estudo verificamos que o gene que codifica para transporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCX1A*) foi encontrado reprimido por 6-OHCHN o que pode ser um fator contribuinte para a toxicidade observada (Figura 26A). Além disso, HPA de três anéis podem causar bradicardia devido à inibição das correntes de potássio repolarizantes no coração (MILAN et al., 2003), sugerindo que o transportador de canal de potássio *kcnh2* cardíaca como um possível alvo molecular (KEATING; SANGUINETTI, 2001; MITCHESON et al., 2000) O gene *KCNH2* teve sua expressão reduzida na exposição com petróleo bruto (SØRHUS et al., 2016), e, essa mesma tendência foi observada no presente estudo (Figura 26B).

A proteína LRR10 contém sete motivos de repetições de leucinas, porém, até o momento não foram identificados outros domínios nas regiões N-terminais ou C-terminais presentes em outras proteínas LRR. Devido à falta de um domínio funcional em LRR10, é difícil hipotetizar a sua função molecular exata a partir da sua sequência de aminoácidos. O gene *LRR10* é conservado na maioria dos vertebrados e está presente num número crescente de proteínas com diversas funções, tais como inibição enzimática, crescimento celular, adesão celular, transdução de sinal, regulação da expressão gênica, sinalização de apoptose e desenvolvimento (KOBE; KAJAVA, 2001). Acredita-se que o motivo LRR funcione como um domínio de interação com proteínas, podendo regular processos celulares através da interação com outros fatores que são críticos para o desenvolvimento cardíaco e função. Apesar disso, a expressão do gene *LRR10* não apresentou alterações significativas após exposição ao 6-OHCHN.

Alguns estudos demonstraram que modulação de genes cardíacos pode ocorrer pela via estrogênica não clássica, através do receptor de estrogênio acoplado à proteína G1 (GPER). Devido à atividade antiestrogênica de 6-OHCHN, sugere-se que este composto poderia interagir com GPER na superfície da membrana. A co-exposição do antagonista de GPER e 6-OHCHN não causou alterações significativas nos efeitos de sobrevivência ou deformidades de embriões. Adicionalmente, os níveis transcricionais de *GPER* não foram alterados,

porém, houve uma tendência para um aumento na expressão de *GPER* com tratamento com 6-OHCHN.

4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em termos gerais foi verificado um aumento da toxicidade de 6-OHCHN no desenvolvimento embrionário de *peixe-zebra*. Os genes envolvidos na diferenciação cardíaca (*hand2* e *lrrc10*) provavelmente não estão associados aos resultados de mortalidade e deformidade geradas por 6-OHCHN nesta fase inicial de 2 hpf. Entretanto, os transportadores iônicos (*nck1* e *kchna*) encontrados na morfogênese cardíaca podem ter um papel crucial durante a exposição. A bioacumulação de 6-OHCHN possivelmente desempenha um papel importante no aumento das deformidades geradas devido à redistribuição que resulta em efeitos tóxicos nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário (4º dia após a exposição). Estudos adicionais de transcrição gênica e expressão proteica deverão ser realizados, utilizando outras moléculas-alvo afetadas pelas vias estrogênicas clássicas por 17 β -estradiol (E2) e transportadores iônicos (*KCHNB*) com o objetivo de elucidar o mecanismo celular e molecular responsáveis pela toxicidade no desenvolvimento de *peixe-zebra*. Existe também a necessidade do desenvolvimento de metodologias mais precisas para medir 6-OHCHN em embriões de *peixe-zebra*.

4.7 PERSPECTIVAS

Para darmos continuidade aos resultados apresentados neste capítulo, as perspectivas são:

Selecionar e avaliar novos genes envolvidos no desenvolvimento cardíaco, agora mediados pela via de receptor estrogênico clássica por 17β -estradiol (E2).

Avaliar outras deformidades provocadas por 6-OHCHN como batimentos cardíacos e desenvolvimento vascular.

Avaliar a formação e degradação de metabólitos resultantes do 6-OHCHN combinado com alterações de temperatura, salinidade e/ou pH.

Verificar os efeitos de ensaios semelhantes com peixes em estágio larval e adultos.

Avaliar possível transferência vertical na exposição de peixes adultos aos embriões.

Desenvolver métodos de detecção de 6-OHCHN mais precisos.

CAPÍTULO V – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES

As informações geradas neste trabalho servem como base para futuros estudos na área de toxicologia aquática visando à elucidação do papel funcional das proteínas identificadas em *C. brasiliiana* bem como no papel de genes-alvo no desenvolvimento de *D. rerio*, fornecendo subsídios para um melhor conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares de toxicidade em animais aquáticos. Espera-se contribuir para a compreensão de diferentes aspectos da biologia molecular e da fisiologia do retículo endoplasmático de brânquias de ostra *C. brasiliiana*, bem como de espécies relacionadas. O perfil de expressão de proteínas aqui apresentadas sugere ainda a utilização da ostra *C. brasiliiana* para o biomonitoramento ambiental, utilizando-se essas proteínas biomarcadores como potenciais candidatas a biomarcadores de contaminação aquática. Visamos também identificar genes normalizadores para análise transcricional em diferentes condições experimentais para posteriores estudos moleculares utilizando PCR quantitativa em tempo real. Por fim, com o intuito de aumentar as informações sobre os efeitos de compostos foto-oxidados do petróleo avaliou-se a exposição por 6-hidroxicriseno no desenvolvimento embrionário de *D. rerio*.

Capítulo 2

- Das onze proteínas diferencialmente expressas identificadas neste estudo, seis poderiam ser potencialmente usadas como PEP em brânquias. Estas proteínas estão envolvidas com metabolismo lipídico / xenobiótico (CYP6A e P450 RED), fagossomo mediados por RE (alfa and beta tubulina) e processamento e degradação de proteínas no RE (tioredoxina e ubiquitina E3).
- Essas proteínas representam novos potenciais biomarcadores em exposições à FAD no RE de brânquias de ostra, as quais poderão ser utilizadas em estudos posteriores.
- Conclui-se que a avaliação de proteínas microsossomais foi uma poderosa ferramenta para avaliar os efeitos de derramamento de óleo e para compreender os mecanismos que envolvem o retículo endoplasmático (RE) frente à exposição a este tipo de xenobiótico.

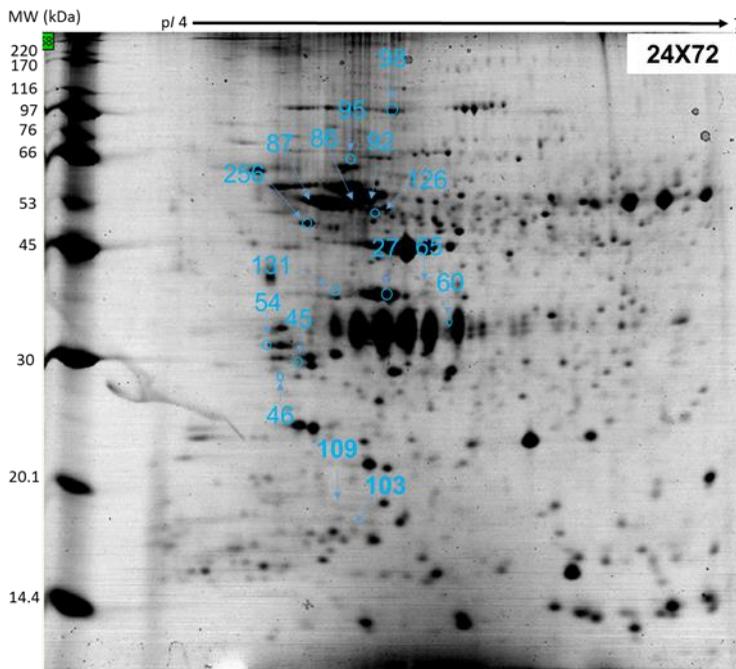
Capítulo 3

- Identificamos diferentes conjuntos de genes que são adequados para a normalização de dados de qRT-PCR em cada desenho experimental.
- Os genes *ank*, *gapdh* e *efa-1* foram os mais estáveis em ostras expostas a PHE a diferentes temperaturas.
- Os genes *ank*, *actb* e *tubb* foram selecionados como genes normalizadores para as ostras expostas a PHE em diferentes salinidades.
- Os genes *tuba*, *28S* e *ank* foram indicados para as ostras expostas à FAD.
- Este é o primeiro estudo a avaliar a estabilidade transcrita de *ank* como gene de referência, que foi considerado candidato promissor como gene normalizador em estudos posteriores.
- Os genes de referência aqui relatados serão úteis na identificação de genes relacionados com processos biológicos e para validação de função de genes em *C. brasiliana*, e também na seleção de genes de referência para outras espécies de ostras ou bivalves.

Capítulo 4

- A exposição com 6-OHCHN gerou aumento da toxicidade no desenvolvimento embrionário de peixe-zebra.
- Os genes envolvidos na diferenciação cardíaca e morfogênese (*HAND2* e *LRRC10*) provavelmente não estão associados com os resultados de mortalidade e deformidade geradas por 6-OHCHN nesta fase inicial de 2 hpf.
- Os transportadores iônicos (*NCK1* e *KCHNA*) expressos durante morfogênese cardíaca podem ter um papel importante durante a exposição por 6-OHCHN.
- A bioacumulação potencial de 6-OHCHN provavelmente deve desempenhar um papel crucial nas deformidades geradas devido à redistribuição dos compostos químicos que resultam em efeitos tóxicos nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário (4º dia após a exposição).

ANEXO I

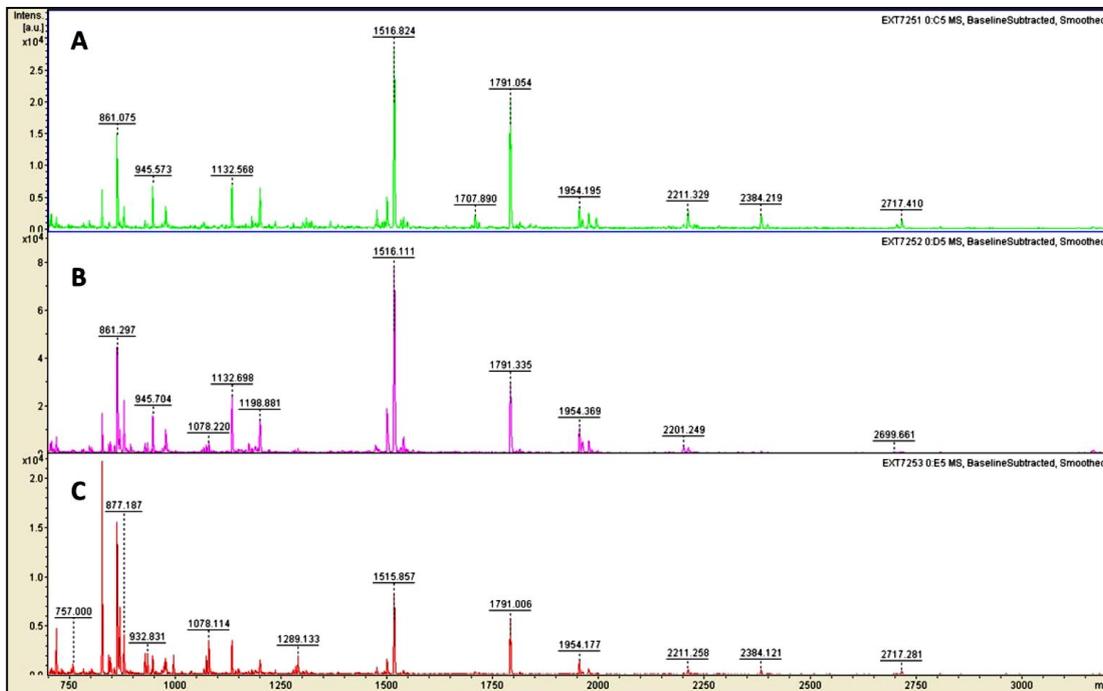


Gél bidimensional (2-DE) representativo, contendo as proteínas microsossomais de brânquias de *C. brasiliiana*, as quais apresentaram expressão diferencial ($p < 0,05$) no grupo exposto à FAD por 24 h comparado àquele exposto por 72 h à 10% de fração acomodada em água (FAD). As massas moleculares (MW) com valores entre 220 a 14,4 kDa estão indicadas ao lado esquerdo do gel e o gradiente de pH 4-7 está indicado acima do gel. O conteúdo do extrato protéico solúvel total contendo 300 μg foi separado por isoeletrofocalização em *strip* de 13 cm (pH 4-7), seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. Após fixação, o gel foi corado com CBB G-250.

Proteínas identificadas por MS e/ou MS / MS com $p < 0,05$ a partir de microsossomos de brânquias de *C. brasiliiana*, após exposição a 10% FAD por 24h e 72h.

Nº Spot	Nome da proteína	Espécie e Código de Acesso (UNIPROT)	Nº Vezes	MW/PI	MASCOT	Blastp nrNCBI	Domínio protéico ^J	Peptídeo sequenciado
1	Actina	<i>Crassostrea gigas</i> C4NY57	↑1,7	44 5,3	85 4,50e-03	144 6e-45	pfam00022/ smart00268	K.SYELPDGQVITIGNER.F
2	Actina	<i>Crassostrea gigas</i> K1QG58	↑1x	44 5,2	98 2,50e-04	85 7e-23	pfam00022/ smart00268	K.SYELPDGQVITIGNER.F
3	Actina	<i>Crassostrea ariakensis</i> A8WE66	↑1,5x	44 5,1	86 3,50e-03	136 3e-38	pfam00022/ smart00268	K.SYELPDGQVITIGNER.F
98	α-Tubulina	<i>Crassostrea gigas</i> K1R473	↓1,0x	94 5,4	123 2,1e-008	283 2e-93	pfam0395/ pfam00091	K.EDAANNYAR.G
87	β-Tubulina	<i>Crassostrea gigas</i> K1QAJ5	↓1,5x	58 5,1	100 4,2e-006	257 3e-83	pfam03953/ pfam00091	R.FPGQLNADLR.K
55	14-3-3 Proteína zeta	<i>Crassostrea gigas</i> KIPHM8	↑1,6	32 4,7	63 2,10e-02	62 5e-12	pfam00244/ smart00101	R.YLAEFATGTDR.K
45	14-3-3 Proteína zeta	<i>Crassostrea gigas</i>	↑1x	30 5,0	74 3,90e-03	70 4e-15	pfam00244/ smart00101	K.LVENYKPLTNEERN K.KLVENYKPLTNEER.N

K1P9N7								
92	Transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94, partial (p97)	<i>Crassostrea gigas</i> K1Q9R2	↓1,0x	59 5,2	54 1,50e-01	84 5e-19	pfam00004AAA/ cd00009	0
57	Proteína inibidora de apoptose (IAP)	<i>Crassostrea gigas</i> K1PPI1	↑1,6	30 4,5	45 1,30e+00	69 9e-15	pfam00653	K.TSESASSGK.R
54	14-3-3 Proteína zeta	<i>Crassostrea gigas</i> K1P9N7	↓1,1x	32 4,4	54 1,80e-01	34 2,0e-02	pfam00244/ smart00101	R.YLAEFATGTDR.K
51	Inibidor da dissociação da proteína Rho/GDP	<i>Crassostrea gigas</i> K1QCM0	↓1,0x	20 5,4	50 4,20e-07	169 6e-53	pfam02115	K.VSFYVQR.E
65	Proteína dissulfeto isomerase A5 (PDI5)	<i>Crassostrea gigas</i> K1QYJ3	↑1,0x	39 5,5	53 2,20e-01	40 5e-04	pfam00085/ PTZ00102	0
144	Alanina - glioxilato aminotransferase 2-like 1	<i>Crassostrea gigas</i> K1R5C6	↓2x	30 4,3	54 1,50e-01	145 4e-42	PRK08117/ cd00610	0



Perfil dos fragmentos trípticos de três actinas identificadas por PMF (MALDI-TOF), correspondentes aos *spots* 01, 02 e 03, excisados dos géis 2-DE.

REFERÊNCIAS

AEPPLI, C. et al. Oil weathering after the Deepwater Horizon disaster led to the formation of oxygenated residues. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 16, p. 8799–8807, 2012.

ALLGOOD JR., O. E. et al. Estrogen prevents cardiac and vascular failure in the “listless” zebrafish (*Danio rerio*) developmental model. **General and Comparative Endocrinology**, v. 189, p. 33–42, 1 ago. 2013.

AMAR-COSTESECC, A. et al. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver from rat liver II . Preparation and Composition of the Microsomal Fraction. **The Journal of Cell Biology**, v. 61, n. 11, p. 201–202, 1974.

ANDERSEN, C. L.; LEDET-JENSEN, J.; ORNTOFT, T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a mode-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.

ANGELL, C. **The Biology and Culture of Tropical Oysters**. ICLARM Stud. ed. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1986.

ANTONIO, F. J.; MENDES, R. S.; THOMAZ, S. M. Identifying and modeling patterns of tetrapod vertebrate mortality rates in the Gulf of Mexico oil spill. **Aquatic Toxicology**, v. 1–2, n. 105, p. 2–5, 2011.

AROCHA, F. et al. Update information on the spawning of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, in the Western Central Atlantic. **Collective Volume of Scientific Papers, ICCAT**, v. 52, n. 1, p. 167–176, 2001.

ARUKWE, A. et al. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. **Environmental Research**, v. 107, n. 3, p. 362–370, 2008.

BACH, P. H. .; BAKER, J. **Histochemical and Immunohistochemical Techniques**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991.

BACHERE, E. et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 50–64, 2015.

BADALÀ, F.; NOURI-MAHDAVI, K.; RAOOF, D. A. Tubulin

modifications and their cellular functions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.

BARRON, M. G. Ecological impacts of the deepwater horizon oil spill: implications for immunotoxicity. **Toxicol Pathol**, v. 40, n. 2, p. 315–320, 2012.

BAUMANN, P. C.; HARSHBARGER, J. C. Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 2, p. 168–170, 1995.

BEJARANO, A. C. et al. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 332, n. 1, p. 49–59, 2006.

BENNETT, V.; BAINES, A. J. Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells Into Tissues. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1353–1392, 2001.

BERNANRD GOLSTEIN;M.D. HOWARD J. OSOFSKY; MAUREEN Y. The Gulf Oil Spill. p. 1334–1348, 2011.

BERTILSSON, S.; WIDENFALK, A. Photochemical degradation of PAHs in freshwaters and their impact on bacterial growth -- influence of water chemistry. **Hydrobiologia**, v. 469, n. 1, p. 23–32, 2002.

BRASIL. **Plano Nacional de Energia 2030**. EPE ed. Rio de Janeiro: p.412., 2007.

BRASIL. **Balanco Energético Nacional 2012**. Rio de Janeiro: Grupo Comunicação e Marketing Ltda., p.57, 2012.

BRASIL; ENERGIA, M. DE M. E. **Plano nacional de energia 2030**. Rio de Janeiro: Copyright, 2007.

BREUZA, L. et al. Proteomics of Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) Membranes from Brefeldin A-treated HepG2 Cells Identifies ERGIC-32 , a New Cycling Protein That Interacts. **The journal of biological chemistrythe journal of biological chemistry**, v. 279, n. 45, p. 47242–47253, 2004.

BROWNE, G. J.; PROUD, C. G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 22, p. 5360–5368, 2002.

- BUCHBERGER, A.; SCHINDELIN, H.; HÄNZELMANN, P. Control of p97 function by cofactor binding. **FEBS Letters**, v. 589, n. 19, p. 2578–2589, 2015.
- BURGESS, R. M.; AHRENS, M. J.; HICKEY, C. W. Geochemistry of PAHs in Aquatic Environments: Source, Persistence and Distribution PAHs. In: **Ecotoxicological Perspective**. [s.l.] Wiley Online Library, 2003. p. 35–45.
- CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295–311, 2000.
- CAO, C. W. et al. Effects of phenol on metabolic activities and transcription profiles of cytochrome P450 enzymes in *Chironomus kiinensis* larvae. **Bulletin of Entomological Research**, v. 106, n. 1, p. 73–80, 2016.
- CHAPMAN, J. R.; WALDENSTRÖM, J. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–18, 2015.
- CHAVEZ-RODRIGUEZ, M. F.; NEBRA, S. A. Assessing GHG emissions, ecological footprint, and water linkage for different fuels. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 24, p. 9252–9257, 2010.
- CIFUENTES, A. D. et al. Novel Cytochrome P450 Genes , CYP6EB1 and CYP6EC1 , are Over-Expressed in Acrinathrin-Resistant *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera : Thripidae) Over-Expressed in Acrinathrin-Resistant *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera : Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 3, p. 1006–1018, 2012.
- CONAMA. RESOLUÇÃO CONAMA nº 273 de 29 de novembro de 2000. p. 800–809, 2000.
- D' ADAMO, R;PELOSI S; TROTTA, P.; SANSONE, G. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. **Marine chemistry**, v. 56, p. 45–49, 1997.
- DALLE-DONNE, I. et al. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 12, p. 1624–1632, 15 dez. 2001.
- DESJARDINS, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 4, p. 280–91, 2003.
- DOMBROWSKI, J. E.; MARTIN, R. C. Evaluation of reference genes for

quantitative RT-PCR in *Lolium temulentum* under abiotic stress. **Plant Science**, v. 176, n. 3, p. 390–396, 2009.

DOWLING, V. A.; SHEEHAN, D. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5597–5604, 2006.

DU, Y. et al. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. **Fish Shellfish Immunol**, v. 34, n. 3, p. 939–945, 2013.

DUCLOS, S.; DESJARDINS, M. Organelle Proteomics. In: **Gel-Free Proteomics: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 117–128.

FABIOUX, C. et al. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 2, p. 592–598, 2004.

FAGONE, P.; JACKOWSKI, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, p. S311-6, 2009.

FAKSNESS, L.; JOHAN, P.; SYDNES, L. K. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, p. 1746–1754, 2008.

FENG, L. et al. Identification of Reference Genes for qRT-PCR Analysis in Yesso Scallop *Patinopecten yessoensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–10, 2013.

FERRARI, D. M.; SÖLING, H. D. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. **The Biochemical journal**, v. 339 (Pt 1, p. 1–10, 1999.

FILBY, A. L.; TYLER, C. R. Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. **BMC molecular biology**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2007.

FILHO, A. M. DE S. **Planos nacionais de contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise da experiência de países representativos das américas para implantação no caso do Brasil**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do rio de Janeiro, 2006.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research** , v. 44, n. D1, p. D279–D285, 4

jan. 2016.

FITZPATRICK, P. J.; SHEEHAN, D.; LIVINGSTONE, D. R. Studies on Isoenzymes of Glutathione S-Transferase in the Digestive Gland of *Mytilus galloprovincialis* With Exposure to Pollution. **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 241–244, 1995.

FLORES-NUNES, F. et al. Changes in protein expression of pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ to urban sewage. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17267–17279, 2015.

FORBES, V. E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 272–280, 2006.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 2, p. 253–267, 2006.

GALVÃO, M. S. N.; PEREIRA, O. M.; HILSDORF, A. W. S. Molecular identification and distribution of mangrove oysters (*Crassostrea*) in an estuarine ecosystem in southeast Brazil: Implications for aquaculture and fisheries management. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 10, p. 1589–1601, 2013.

GE, Y. et al. Environmental OMICS: Current Status and Future Directions. **Journal of Integrated OMICS**, v. 3, n. 2, p. 75–87, 26 dez. 2013.

GOLDSTONE, J. V et al. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 643, 2010.

GOMES, C. H. A. M. et al. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 967–76, 2014a.

GOMES, T. et al. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 327–336, 2014b.

GONZALEZ, M. et al. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 4, p. 332–339, 2007.

GORG, A. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. **Handbook**, p. 163, 2004.

GRIMES, C. B. et al. Young king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, in the Gulf of Mexico, a summary of the distribution and occurrence of larvae and juveniles, and spawning dates for Mexican juveniles. **Bulletin of Marine Science**, v. 46, n. 3, p. 640–654, 1990.

HAFFTER P, GRANATO M, BRAND M, MULLINS MC, HAMMERSCHMIDT M, KANE DA, ODENTHAL J, VAN EEDEN FJ, JIANG YJ, HEISENBERG CP, KELSH RN, FURUTANI-SEIKI M, VOGELSANG E, BEUCHLE D, SCHACH U, FABIAN C, N.-V. C. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Development**, v. 123, p. 1–36, 1996.

HAYAKAWA, K. et al. Interaction of Hydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons To Estrogen Receptor. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 28, n. 4–5, p. 382–391, 2008.

HEINTZ, R. A; SHORT, J. W.; RICE, S. D. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 494–503, 1999.

HIGA, A. et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Transcription Factor ATF6 Requires the Disulfide Isomerase PDIA5 To Modulate Chemoresistance. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 10, p. 1839–1849, 2014.

HOKSTAD, JORUNN NERBO; DALIN, PER S.; JOHSEN, S. Chemical and Ecotoxicological Characterisation of Oil Water Systems. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 5, n. 1, p. 75–80, 1999.

HOLDWAY, D. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperate and tropical marine ecological processes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 185–203, 2002.

HUANG, T.-S. et al. Stress-induced expression of protein disulfide isomerase associated 3 (PDIA3) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 154, n. 4, p. 435–442, 2009.

HUGGETT, R. J. **Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton, Fla: Lewis Publishers, 1992.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. A. Endoplasmic reticulum: Stress,

signalling and apoptosis. **Current Science**, v. 93, n. 12, p. 1684–1696, 2007.

INCARDONA, J. P. et al. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 303–316, 2013.

INCARDONA, J. P. et al. Deepwater Horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. E1510-8, 2014.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191–205, 2004.

ITOFI. ITOFF - INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED. Oil tanker spill statistics.

IZAGIRRE, U. et al. Combined effects of thermal stress and Cd on lysosomal biomarkers and transcription of genes encoding lysosomal enzymes and HSP70 in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 149, n. 15, p. 145–156, 2014.

JACOB, F. et al. Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013.

JAYASINGHE, B. S.; VOLZ, D. C. Aberrant ligand-induced activation of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) results in developmental malformations during vertebrate embryogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 125, n. 1, p. 262–273, 2012.

JONGE, H. J. M. et al. Evidence based selection of housekeeping genes. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, p. 1–5, 2007.

JONSSON, H. et al. Protein responses in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to organic pollutants: A combined CYP-antibody/proteomic approach. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 49–56, 2006a.

JONSSON, H. et al. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 42–48, 2006b.

JUNG, E. Proteomics meets cell biology: The establishment of subcellular proteomes Proteomics and 2-DE. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3369–3377, 2000.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1116, p. 271–302, 2014.

KAMEL, N. et al. Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a]pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 534–543, 2012.

KARIMULLINA, E. et al. Daphnia HR96 is a promiscuous xenobiotic and endobiotic nuclear receptor. **Aquatic Toxicology**, v. 116–117, p. 69–78, 2012.

KAWABE, S.; YOKOYAMA, Y. Novel isoforms of heat shock transcription factor 1 are induced by hypoxia in the pacific oyster *crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 315 A, n. 7, p. 394–407, 2011.

KEATING, M. T.; SANGUINETTI, M. C. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiac Arrhythmias. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 569–580, 23 fev. 2001.

KENNISH, M. J. **Ecology of estuaries: Anthropogenic effects**. Londres: CRC Press, 1992.

KI-HYUN KIM, DAGMARA S. ANTKIEWICZ, LONG YAN, KEVIN W. ELICEIRI, WARREN HEIDEMAN, R. P. AND Y. L. Lrrc10 is required for early heart development and function in zebrafish. **Dev Biol.**, v. 308, n. 2, p. 494–506, 2007.

KIMMEL, C. et al. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, p. 253–310, 1995.

KLEIZEN, B.; BRAAKMAN, I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 343–349, 2004.

KNOBLACH, B. et al. ERp19 and ERp46, New Members of the Thioredoxin Family of Endoplasmic Reticulum Proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, p. 1104–1119, 2003.

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 6, p. 725–732, 1 dez. 2001.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of**

Applied Genetics, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.

LACAZE, J. C.; VILLEDON DE NAÏDE, O. Influence of illumination on phytotoxicity of crude oil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 7, n. 4, p. 73–76, 1976.

LACROIX, C. et al. A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 304–313, 2014.

LANG, K. L.; GRIMES, C. B.; SHAW, R. F. Variations in the age and growth of yellowfin tuna larvae, *Thunnus albacares*, collected about the Mississippi River plume. **Environmental Biology of Fishes**, v. 39, n. 3, p. 259–270, 1994.

LAZOSKI, C. et al. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: Evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 426, p. 197–212, 2011.

LEHTONEN, K. K. et al. Biomarkers of pollution effects in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* collected from the southern coast of Finland (Baltic Sea). **Marine Ecology Progress Series**, v. 322, p. 155–168, 2006.

LEWIS, C.; POOK, C.; GALLOWAY, T. Reproductive toxicity of the water accommodated fraction (WAF) of crude oil in the polychaetes *Arenicola marina* (L.) and *Nereis virens* (Sars). **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 73–81, 2008.

LISKA, A. J. et al. Homology-based functional proteomics by mass spectrometry : Application to the *Xenopus* microtubule-associated proteome. **Proteomics**, p. 2707–2721, 2004.

LISKA, A. J.; SHEVCHENKO, A. Combining mass spectrometry with database interrogation strategies in proteomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 291–298, 2003.

LIU, F.; WANG, W. X. Proteome pattern in oysters as a diagnostic tool for metal pollution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239–240, p. 241–248, 2012.

LIU, L. L. et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2015.

LOSSES, D.; LARGER, L. HHS Public Access. **Nature reviews Cancer**, v.

16, n. 3, p. 338–348, 2016.

LU, Y. et al. Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2013.

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 652–660, 2011.

LÜCHMANN, K. H. et al. Suppressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliana* exposed to a diesel fuel water-accommodated fraction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1249–1253, 2012.

LÜCHMANN, K. H. et al. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic toxicology**, v. 166, p. 10–20, 2015.

LUCKENBACH, T.; EPEL, D. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 6, p. 392–400, 2008.

MANDUZIO, H. et al. Proteome modifications of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4958–63, dez. 2005.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Suppl. 1, p. 225–229, 2011.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 28 jan. 2015.

MATTOS, J. J. et al. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. **Marine environmental research**, v. 69 Suppl, p. S31-3, jan. 2010.

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 315–326, 2005.

- MEILLER, J. C.; BRADLEY, B. P. Zinc concentration effect at the organismal, cellular and subcellular levels in the eastern oyster. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 401–404, 2002.
- MELWANI, A. R. et al. Mussel watch update: Long-term trends in selected contaminants from coastal California, 1977-2010. **Marine Pollution Bulletin**, v. 81, n. 2, p. 291–302, 2014.
- MENZEL, W. **Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture**. first ed. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1991.
- MEUSSER, B. et al. ERAD: The long road to destruction. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 8, p. 766–772, 2005.
- MI, J. et al. Peroxisomal proteomics, a new tool for risk assessment of peroxisome proliferating pollutants in the marine environment. **Proteomics**, v. 5, n. 15, p. 3954–3965, 2005.
- MI, J.; APRAIZ, I.; CRISTOBAL, S. Peroxisomal proteomic approach for protein profiling in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to crude oil. **Biomarkers**, v. 12, n. 1, p. 47–60, 1 jan. 2007.
- MILAN, D. J. et al. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. **Circulation**, v. 107, n. 10, p. 1355–1358, 2003.
- MITCHESON, J. S. et al. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 22, p. 12329–12333, 2000.
- MORI, R. et al. Both b-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. **Prostate**, v. 68, n. 14, p. 1555–1560, 2008.
- MUSASIA, F. K. et al. Sex-specific induction of CYP6 cytochrome P450 genes in cadmium and lead tolerant *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 97, 2013.
- NEFF, J. M. **Bioaccumulation in Marine Organisms - Effects of Contaminants from Oil Well Produced Water**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2002.
- NETO, JOSÉ ANTÔNIO BAPTISTA; PATCHINELAM, SORAYA MAIA; WALLNER-KERSANACH, M. **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- NETTO, A. D. P. et al. Avaliação Humana da Contaminação por

Hidrocarbonetos, Policíclicos Aromáticos (HPAs) e Seus Derivados Nitrados (NHPAs): Uma Revisão Metodológica. **Química Nova**, p. 765–773, 1999.

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

OMIECINSKI, C. J. et al. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. SUPPL.1, 2011.

OOST, D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

ORBEA, A. et al. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). **Aquatic toxicology**, v. 58, n. 1–2, p. 75–98, jul. 2002.

PAMPANIN, D. M. et al. Background for the BEEP Stavanger workshops: Biological effects on marine organisms in two common, large, laboratory experiments and in a field study: Comparison of the value (sensitivity, specificity, etc.) of core and new biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 78, Supple, p. S1–S4, 1 jun. 2006.

PASQUEVICH, M. Y. et al. Effect of crude oil petroleum hydrocarbons on protein expression of the prawn *Macrobrachium borellii*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 157, n. 4, p. 390–396, 2013.

PENG, F. et al. Proteomic and Bioinformatics Analyses of Mouse Liver Microsomes. **International Journal of Proteomics**, v. 2012, p. 1–24, 2012.

PENGERUD, B. et al. Photo-induced toxicity of north sea crude oils toward bacterial activity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 15, n. 4, p. 142–146, 1984.

PETERSEN, G. I.; KRISTENSEN, P. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, n. 7, p. 1385–1395, 1998.

PETERSON, C. H. The “Exxon Valdez” oil spill in Alaska: Acute, indirect and chronic effects on the ecosystem. **Advances in Marine Biology**, v. 39, p. 1–103, 2001.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes,

differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509–515, 2004.

POLLINO, C. A.; HOLDWAY, D. A. Toxicity Testing of Crude Oil and Related Compounds Using Early Life Stages of the Crimson-Spotted Rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 3, p. 180–189, 2002.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 352 LP-358, 20 out. 1989.

RAND, M. D.; LOWE, J. A.; MAHAPATRA, C. T. Drosophila CYP6g1 and its human homolog CYP3A4 confer tolerance to methylmercury during development. **Toxicology**, v. 300, n. 1–2, p. 75–82, 2012.

RICHARD T. DI GIULIO, D. E. H. **The Toxicology of Fishes**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2008.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. J. et al. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1535–1543, 2003.

ROGERS, L. D.; FOSTER, L. J. The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 47, p. 18520–5, 2007.

SACO-ALVAREZ, L. et al. Toxicity and phototoxicity of water-accommodated fraction obtained from Prestige fuel oil and Marine fuel oil evaluated by marine bioassays. **The Science of the total environment**, v. 394, n. 2–3, p. 275–82, 15 maio 2008.

SAEED, T. et al. Effect of environmental factors on photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water-soluble fraction of Kuwait crude oil in seawater. **Marine Environmental Research**, v. 72, n. 3, p. 143–150, 2011.

SANCHEZ, B. C.; RALSTON-HOOPER, K.; SEPÚLVEDA, M. S. Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 274–282, 2011.

SANO, R.; REED, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3460–3470, 2013.

SCHLENK, D. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological

Risk Assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 99, p. 48–53, 1999.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 5857–5864, 1998.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHEVCHENKO, A.; VALCU, C. M.; JUNQUEIRA, M. Tools for exploring the proteomosphere. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 137–144, 2009.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2006.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 69, n. 1, p. 112–20, jan. 2008.

SINGER, M. M. et al. Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 11, p. 1007–1016, 2000.

SØRHUS, E. et al. Crude oil exposures reveal roles for intracellular calcium cycling in haddock craniofacial and cardiac development. **Scientific Reports**, v. 6, n. 5020, p. 31058, 2016.

STAINIER, D. Y. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 1, p. 39–48, 2001.

STEINERT, S. A. DNA damage as a bivalve biomarker. **Biomarkers**, v. 4, n. 6, p. 492–496, 1 jan. 1999.

SUN, L. et al. Transcription profiling of 12 Asian GYPSY moth (*Lymantria dispar*) cytochrome P450 genes in response to insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 4, p. 181–194, 2014.

TANANOVA, O. N. et al. Changes in proteome profiles of rat liver microsomes induced by silicon dioxide nanoparticles. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 125–

129, 2014.

TANG, R. et al. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 5, p. 384–390, 2007.

TANSEL, B. et al. Persistence profile of polyaromatic hydrocarbons in shallow and deep Gulf waters and sediments: Effect of water temperature and sediment-water partitioning characteristics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2659–2665, 2011.

TATUSOV, R. L.; KOONIN, E. V; LIPMAN, D. J. A Genomic Perspective on Protein Families. **Science**, v. 278, n. 5338, p. 631–637, 1997.

TRAN, D. Q. et al. The Anti-estrogenic Activity of Selected Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Yeast Expressing Human Estrogen Receptor One of the largest classes of chemicals measured in some contaminated ecosystems are polyaromatic hydrocarbons (PAH). PAHs are produce. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 108, n. 1764, p. 102–108, 1996.

TSAI, Y. C.; WEISSMAN, A. M. The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 7, p. 764–778, 2010.

VAN LIPZIG, M. M. H. et al. Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 41–55, 2005.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002a.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002b.

VEMBAR, S.; BRODSKY, J. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. **Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 12, p. 944–957, 2009.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. London: Taylor & Francis. [s.l: s.n.].

WERTHEIM, P. H. Brazilian pre-salt reserves bring role of oil industry into question. **Oil&Gas Journal**, 2009.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice Electrophoresis in Practice**. Third Edit ed. Amsterdam: Wiley-Vch, 2002. v. 5

WETMORE, B.; MERRICK, B. Toxicoproteomics: Proteomics Applied to Toxicology and Pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 6, p. 619–642, 1 nov. 2004.

WONG, D. M.; ADELI, K. Microsomal Proteomics. In: TYTHER, R.; SHEEHAN, D. (Eds.). . **Two-Dimensional Electrophoresis Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 273–289.

WU, C. C. et al. Organellar Proteomics Reveals Golgi Arginine. **Molecular Biology of the cell**, v. 15, p. 2907–2919, 2004.

XIE, F. et al. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, 2012.

YANG, C. et al. Temperature and Development Impacts on Housekeeping Gene Expression in Cowpea Aphid, *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae). **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0130593, 2015.

YE, Y. et al. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 841–847, 24 jun. 2004.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. São Paulo: Rima, 2006.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, 4 out. 2012.

ZHANG, G. et al. Molecular basis for adaptation of oysters to stressful marine intertidal environments. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 357–381, 2016.

ZHAO, X. et al. Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–8, 2012.

ZHENG, Y. T. et al. Evaluation and validation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–9, 2014.

ZHU, X. et al. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2014.